N° d'ordre : 109

THÈSES

PRESENTEES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES
(DOCTORAT D'ETAT)

PAR

Annie MAYRARGUE-KODJA

PREMIERE THESE

SUR L'OXYDATION ENZYMATIQUE DE DIVERS PHENOLS D'INTERET BIOLOGIQUE

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

---

soutenues le 17 Décembre 1962 devant la Commission d'Examens :

Messieurs les Professeurs :

PRAT	*Président*
DESNUELLE	*Examinateurs*
RICARD	

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547003_0003

N° d'ordre : 109

THÈSES

PRESENTEES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES
(DOCTORAT D'ETAT)

PAR

Annie MAYRARGUE-KODJA

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

PREMIERE THESE

SUR L'OXYDATION ENZYMATIQUE DE DIVERS PHENOLS D'INTERET BIOLOGIQUE

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le ..... devant la Commission d'Examen :

Messieurs les Professeurs :

PRAT	*Président*
DESNUELLE	*Examinateurs*
RICARD	*Examinateurs*

UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

FACULTÉ DES SCIENCES DE MARSEILLE

Mort au Champ d'Honneur : M. F. MARTY
Maître de conférences de mathématiques
(14 juin 1940)

Doyens honoraires : MM. MARCHAUD, TRAYNARD, CORROY, CHOUX.

Professeurs honoraires : MM. J. MARCHAUD, E. TRAYNARD, G. PETIT, R. THIRY, J. BOSLER, A. TIAN, L. MARGAILLAN, P. BENOIT, H. CABANNES, P. CHOUX.

Doyen : M. P. ROUARD — *Assesseurs :* MM. A. GUILLEMONAT, J.-M. PERES.

Secrétaire principal : M. C. MOYNAULT.

PROFESSEURS

Géologie	MM.	CORROY G.
Agronomie tropicale		CERIGHELLI R.
Mécanique expérimentale des fluides		VALENSI J.
Physique générale		ROUARD P.
Botanique		PRAT H.
Chimie biologique		DESNUELLE P.
Biologie générale		ABELOOS M.
Physique industrielle		MERIGOUX R.
Calcul différentiel et intégral		VINCENSINI P.
Chimie générale		CALVET E.
Astronomie		FEHRENBACH C.
Mécanique de l'atmosphère		FAVRE A.
Chimie industrielle		GUILLEMONAT A
Océanographie biologique		PERES J.-M.
Chimie M.P.C.		CARPENI G.
Physique expérimentale		JAUSSERAN C.
Biologie végétale		MOLINIER R.
Physique M.P.C.		DOUCET Y.
Méthodes mathématiques de la physique		SOURIAU J.-M.
Electronique		COTTON P.
Chimie S.P.C.N.		METZGER J.
Zoologie		TIMON-DAVID J.
Mathématiques		FOURES L.
Physique		MALE D.
Mathématiques appliquées		BODIOU G.
Chimie des corps gras		NAUDET M.
Psycho-physiologie		PAILLARD J.
Chimie systématique		SAVIDAN L.
Physique théorique		KASTLER D.
Physique S.P.C.N.		BOUSQUET P.
Physique P.C.B.		PESTEIL P.
Mécanique rationnelle et appliquée		CASAL P.
Minéralogie		ROYER L.
Géologie appliquée		GOUVERNET C.
Physique théorique		VISCONTI A.
Mathématiques générales		BLANCHARD A.
Chimie M.P.C.		LEFEBVRE J.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Mécanique des fluides	M^lle	CLARION C.
Biologie animale S.P.C.N.	MM.	AMAR R.
Chimie théorique		JULG A.
Mathématiques générales (Institut de Nice)		WACHS S.
Physiologie animale		CHOUTEAU J.
Biologie marine		DEVEZE L.
Géologie historique	M^me	TAXY S.
Mathématiques M.P.C.	M.	BOUGHON P.
Biologie animale S.P.C.N.	M^me	FURNESTIN M.-L.
Chimie S.P.C.N.	MM.	BERTRAND M.
Physique S.P.C.N.		TROMPETTE J.
Chimie biologique		MONIER R.
Mathématiques		ARAGNOL A.

MAITRES DE CONFERENCES

Chimie M.P.C.	M.	LAFFITTE M.
Dynamique des vibrations		SIDERIADES L.
Physique nucléaire		MANDELBROJT J.
Techniques mathématiques de la physique		BOREL F.
Physiologie animale		DUSSARDIER M.
Géologie marine		BLANC J.
Biologie animale	M^lle	CHANDEBOIS R.
Biologie animale	MM.	BOURDILLON A.
Chimie		GOUZON B.
Physique		PHILIP R.
Physique		BIZOUARD M.
Mathématiques appliquées		GUENOCHE H.
Mathématiques		MOREL H.
Chimie (Nice)		YTHIER C.
Mathématiques (Nice)	M^me	BAUDOIN S.
Botanique	MM.	RICARD J.
Mathématiques M.P.C.		ZERNER M.

CHARGES DE CONFERENCES

Neurophysiologie	M.	MORIN J.
Psycho-physiologie	M^lle	GAVINI H.
Physique	MM.	JEAN P.
Chimie biologique		SENEZ J.
Mathématiques	M^me	COTTON M.
Neurophysiologie	M.	GASTAUD H.
Pétrographie	M^lle	GUEIRARD S.
Chimie	MM.	BEZAGUET A.
Physique (Nice)		COHEN-SOLAL L.
Biologie végétale		MOLINIER R.
Ecologie terrestre et limnique	M^me	SCHACHTER D.
Chimie générale	M^lle	LAGARDE L.
Géologie	M^lle	CATZIGRAS F.
Physique	MM.	GARRON R.
Physiologie animale		CASSAND L.
Mathématiques		OTTL G.
Physiologie animale		GARNIER L.
Chimie industrielle		TRAYNARD J.-C.

A Monsieur le Professeur J. ROCHE

en témoignage de reconnaissance
et de respectueuse admiration.

Qu'il me soit permis d'exprimer ma gratitude

A Monsieur le Professeur DERRIEN,

qui m'a accueillie dans son laboratoire et a suivi mes travaux avec bienveillance.

à Monsieur le Professeur LISSITZKY,

dont les suggestions et les critiques me furent toujours précieuses.

à Mademoiselle SIMONE BOUCHILLOUX,

qui m'a guidée depuis mes débuts dans la recherche et m'a aidée de son expérience et de ses conseils tout au long de ce travail.

A mes camarades du laboratoire :

Je garderai le souvenir de discussions fructueuses et d'une atmosphère d'amicale sympathie.

Je voudrais aussi exprimer mes remerciements

à Monsieur le Professeur PRAT,

qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse.

à Monsieur le Professeur DESNUELLE,

dont j'ai suivi l'enseignement avec le plus grand bénéfice, et qui a bien voulu accepter de juger ce travail.

A Monsieur le Professeur RICARD,

qui a bien voulu siéger dans mon jury.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 13

CHAPITRE I : EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE 17

CHAPITRE II : MATERIEL ET TECHNIQUES

A) Substances mises en œuvre 23
B) Chromatographie sur papier 25
C) Electrophorèse sur papier 29
D) Oxydation par l'oxyde d'argent 29
E) Oxydation par l'oxyde de plomb 29
F) Oxydation par les peroxydases 30
G) Oxydation par les tyrosinases 31
H) Spectrophotométrie 33
I) Manométrie 33
J) Réduction des *o*-quinones monocycliques 33
K) Utilisation de la 2,4-dinitrophénylhydrazine 35

CHAPITRE III : RESULTATS

PEROXYDASES

Action de la peroxydase végétale sur les monophénols 37
Action de la peroxydase végétale sur les *o*-diphénols 48
Action de la myélopéroxydase sur les phénols 49

TYROSINASES

I — Activité du type « tyrosinase » dans le mélanome de HARDING-PASSEY : Action sur la thyronine et les thyronines iodées 50

II — Quelques données nouvelles sur les étapes de la mélanogénèse
A) Caractérisation des *o*-quinones monocycliques dans l'oxydation par la tyrosinase des phénols à chaîne latérale aminée 54
B) Quelques propriétés des aminochromes - Rôle des dérivés indoliques dans la mélanogénèse 61

III — Combinaison de quinones d'intérêt biologique avec la cystéine et le glutathion 64
A) Oxydation de la dopa et de la tyrosine par la ppo KZ en présence de thiols (GSH et CSH). Comparaison avec la noradrénaline et le catéchol 64
B) Oxydation des 5,6-dihydroxyindoles par la ppo KZ en présence de glutathion. Action du glutathion sur le dopachrome 69

IV — Oxydation du catéchol, de la dopa et du 5,6-dihydroxyindole en présence de protéines 71

CHAPITRE IV : DISCUSSION

Peroxydases 75
Tyrosinases 76

CONCLUSIONS GENERALES 81

LISTE DES ABREVIATIONS 83

FORMULES 83

BIBLIOGRAPHIE 85

INTRODUCTION

De nombreux composés à fonction phénolique se rencontrent chez les animaux supérieurs et présentent un intérêt biologique. Parmi eux sont connus depuis assez longtemps la tyrosine, la dopa ou 3,4-dihydroxyphénylalanine (mise en évidence récemment [53] dans la peau) et plusieurs composés à fonction hormonale : thyroxine, 3,5,3'-triiodothyronine, adrénaline, noradrénaline, œstrone, œtradiol, etc... La dopamine (3,4-dihydroxyphényl-éthylamine) est présente dans divers organes [9] et semble être un médiateur du système sympathique [71, 79] en sus de son rôle dans la synthèse de l'adrénaline [cf. 99]. Ces dernières années, on a caractérisé aussi plusieurs dérivés des phénols ci-dessus, formés lors du métabolisme de leur chaîne latérale, et d'autres résultant de la méthylation des hormones de la médullo-surrénale. Citons aussi la sérotonine (5-hydroxytryptamine) rencontrée dans le tractus gastro-intestinal, les plaquettes sanguines, le cerveau et d'autres organes. Son rôle physiologique est encore à déterminer. Cette énumération ne contient que les plus importants parmi les phénols présents chez les animaux supérieurs.

Par leurs fonctions phénoliques, ces composés sont susceptibles de s'oxyder même spontanément, et l'on s'est intéressé à l'action de systèmes oxydants, enzymatiques ou non, présents eux aussi chez les animaux supérieurs. Parmi ces systèmes, nous citerons l'oxygène moléculaire en présence de cytochrome et cytochrome oxydase [134, 135, 148], de céruloplasmine [25, 35, 57, 81, 121, 156], de ferritine [61], de peroxydase et acide dihydroxyfumarique [27, 128], de tyrosinase ; l'eau oxygénée en présence de peroxydase ; le système d'Udenfriend [36, 117, 166]. Tous ces systèmes comportent des métaux (fer ou cuivre), liés à des protéines ou à des complexeurs, et agissent tous sur les *o*-diphénols, certains aussi sur les monophénols. Au cours de ce travail, nous nous limiterons aux oxydations intéressant les fonctions phénoliques, en laissant de côté les oxydations conduisant à une rupture du noyau ou attaquant directement le reste de la molécule.

● Le premier type d'enzyme que nous avons étudié est la peroxydase. C'est un enzyme très répandu, pouvant intervenir dans le métabolisme des phénols, en particulier dans celui des hormones thyroïdiennes. En effet, une peroxydase existe dans la thyroïde, et pourrait jouer un rôle dans la biosynthèse de ces hormones. D'autre part, les peroxydases pourraient intervenir dans les transformations subies par les hormones thyroïdiennes au niveau des tissus.

Nous avons étudié avec quelques détails l'action d'une peroxydase végétale (de raifort) très active, sur les monophénols d'une part (thyronine, tyrosine et leurs dérivés iodés) et sur les *o*-diphénols

d'autre part (dopa, hydroxythyronine, adrénaline). Nous avons ensuite vérifié par quelques expériences qu'un enzyme d'origine animale (extrait de leucocytes) avait une action très comparable à celle de l'enzyme de raifort.

● Le second type d'enzyme étudié dans notre travail est la tyrosinase, encore nommée polyphénoloxydase à cause de sa grande activité sur les polyphénols ayant deux hydroxyles en *ortho* (nous utiliserons ces deux noms au cours de l'exposé, avec l'abréviation ppo.)

C'est un enzyme contenant du cuivre, très répandu dans le règne végétal et chez les animaux inférieurs. Chez les mammifères, sa distribution est limitée : on ne l'a mis en évidence que dans la peau et les follicules pileux au niveau des mélanocytes (*) [50, 53, 104, 164], dans les mélanomes qui dérivent de ces cellules [50, 78, 108, 163] et dans l'épithélium rétinien pigmenté [133]. Cependant l'importance des mélanocytes en physiologie et en pathologie a stimulé la recherche en ce domaine, et les travaux sur ce sujet sont très nombreux. De plus, les réactions catalysées par la tyrosinase peuvent être communes à d'autres systèmes d'oxydation (ainsi il s'avère que la biosynthèse de l'adrénaline utilise le passage de la tyrosine à la dopa, mais on ignore si une tyrosinase intervient) ; or la tyrosinase de champignon que nous avons étudiée est un modèle commode à cause de sa très grande pureté, limitant les réactions secondaires non spécifiques. C'est dans cet esprit, par exemple, que Lissitzky et Bouchilloux ont étudié l'action de cette tyrosinase sur les hormones thyroïdiennes [113, 114].

En présence d'oxygène moléculaire et de tyrosinase, les monophénols (tyrosine, phénol, *p*-crésol...) sont hydroxylés en *ortho*, et les *o*-diphénols (dopa, catéchol...) sont oxydés en *o*-quinones. Les quinones ainsi formées sont douées d'une grande réactivité chimique. Selon les propriétés du milieu où elles apparaissent, les réactions ultérieures et le produit final seront différents. Le rôle physiologique de l'enzyme est de ce fait très variable. La fonction qui fut la première étudiée (et qui permit de caractériser la tyrosinase) est la formation de pigments dans les deux règnes ; elle sera envisagée plus longuement dans l'exposé bibliographique, ainsi que les combinaisons des quinones avec les amines et les thiols, et le durcissement des cuticules d'insectes par tannage des protéines. Nous ne ferons ici que citer la désamination oxydative des acides aminés, bien étudiée *in vitro* [70, 77, 84, 86]. On a aussi discuté le rôle de la tyrosinase comme oxydase terminale de la respiration chez les plantes, par l'intermédiaire du système ci-contre :

$$o\text{-diphénol} \underset{\text{DPNH ou TPNH}}{\overset{O_2 + \text{tyrosinase}}{\rightleftharpoons}} o\text{-quinone}$$

[5, 37, 85, 165, 174]. Pour des tissus animaux même, Kertesz et Albano ont montré que la ppo pouvait jouer ce rôle *in vitro* dans le cas de tumeurs présentant une respiration réduite et une glycolyse aérobie importante [96].

(*) Cependant van Duijn [168] mettait en doute l'existence d'une polyphénoloxydase au niveau des granules où se dépose la mélanine dans les mélanocytes.

Au cours de notre travail sur la tyrosinase, nous avons :

— étudié l'oxydation de la thyronine et de ses dérivés iodés en présence du mélanome de souris de HARDING-PASSEY ;

— apporté des faits expérimentaux nouveaux sur les étapes de la mélanogénèse induite par les tyrosinases :

a) mise en évidence des *ortho*-quinones monocycliques dérivant directement des *ortho*-diphénols, et dont l'existence était mise en doute par certains auteurs ;

b) étude d'aminochromes en solution pure ;

c) caractérisation des dérivés indoliques pendant l'oxydation de dopa par la tyrosinase de champignon ; caractérisation de ces dérivés indoliques dans les milieux d'oxydation de dopa par le mélanome de souris, tissu formateur de mélanines naturelles ;

— cherché à vérifier l'hypothèse présentant les mélanines naturelles comme liées aux protéines par des liaisons covalentes, résultant de la réaction des quinones avec les groupements amines ou thiols des protéines. Cette étude nous a conduite à la caractérisation de thioéthers formés par l'addition de thiols simples (cystéine ou glutathion) aux quinones rencontrées dans la mélanogénèse. Ces mêmes quinones ne réagissent ni avec la sérumalbumine de bœuf, ni avec l'ovalbumine, contrairement à l'*ortho*-benzoquinone issue du catéchol. Nous avons constaté que les mélanines et les protéines peuvent se lier par des forces d'adsorption.

Nous avons aussi réalisé des oxydations par des agents chimiques (oxyde d'argent ou oxyde de plomb) pour comparer les produits ainsi obtenus à ceux qui sont formés dans les oxydations enzymatiques.

Dans l'exposé bibliographique, nous présenterons les travaux antérieurs à nos recherches, qui les ont guidées.

Après un chapitre consacré aux techniques utilisées, nous exposerons les différentes parties de notre travail, et nous discuterons ensuite les résultats obtenus.

CHAPITRE I

EXPOSÉ BIBLIOGRAPHIQUE

1) Peroxydases.

Les peroxydases catalysent la réduction de l'eau oxygénée par des substances diverses qui sont nommées « cosubstrats » ou « donateurs d'hydrogène ». Ces enzymes sont très répandus dans le règne végétal ; on pense que les tissus animaux en contiennent souvent (cf. par ex. [136]), quoique les seules peroxydases animales bien étudiées soient celles du lait (lactoperoxydase) et des leucocytes (myélo- ou verdoperoxydase). Une peroxydase a été récemment mise en évidence dans la glande thyroïde et une autre dans les glandes salivaires par ALEXANDER [1, 2], enzymes utilisant les iodures comme cosubstrat.

Le rôle de cet enzyme dans la synthèse des hormones thyroïdiennes est intéressant à considérer. On sait que la 3,5-diiodotyrosine (DIT) incubée dans certaines conditions à pH compris entre 7,8 et 10, seule ou en présence d'iode ou d'eau oxygénée, se transforme partiellement en thyroxine [72, 88, 139]. Cette transformation par des facteurs uniquement physiques et chimiques est considérée comme un modèle pour la synthèse biologique. On a constaté que l'eau oxygénée activait la formation de thyroxine. Mais il semble qu'elle n'ait aucun rôle direct dans la condensation des deux molécules de DIT et qu'elle n'agisse qu'en favorisant la formation d'iode à partir des iodures libérés dans la destruction d'une partie des molécules de DIT [72]. L'iode aurait deux rôles dans la synthèse des hormones thyroïdiennes : la formation des tyrosines iodées, et le couplage oxydatif de deux molécules pour obtenir les thyronines iodées.

Dans ces conditions il paraissait probable qu'une peroxydase n'aurait aussi qu'un rôle indirect — favorisant la transformation des iodures en iode — contrairement aux hypothèses s'appuyant sur la formation de liaison éther dans l'oxydation peroxydasique du *p*-crésol [172].

LJUNGGREN [119] faisant agir une verdoperoxydase sur la DIT à pH 7,2 a trouvé comme produits de réaction de l'alanine et de la 2,6-diiodobenzoquinone, qu'il pense pouvoir être un intermédiaire dans la synthèse de la thyroxine. Il a plus tard [120] isolé cette quinone iodée de glandes thyroïdes.

L'action de l'eau oxygénée en présence d'une peroxydase sur les hormones thyroïdiennes et sur les autres phénols présents dans l'organisme pouvait par ailleurs être intéressante au niveau des tissus, dans le métabolisme périphérique de ces phénols.

Lorsque nous avons entrepris l'étude de l'action d'une peroxydase sur les phénols apparentés à la tyrosine et à la thyronine [131],

ce sujet avait suscité peu de recherches : Elliott [45, 46] indiquait que la tyrosine, la dopa et l'adrénaline pouvaient servir de donateurs d'hydrogène pour la peroxydase de raifort et pour la lactoperoxydase. Il ne donnait aucun renseignement sur les produits formés. Sizer et Gross [64, 158] annonçaient l'obtention d'un dimère à partir de tyrosine — la « dityrosine » — dont l'étude fut décrite en détail , avec celle de la « dityramine », quelques années plus tard [65], après nos propres recherches.

Polis et Shmukler [140] utilisaient la dopa dans un dosage colorimétrique de l'activité de leur lactoperoxydase cristallisée, sans préciser les réactions chimiques correspondantes.

Les seuls travaux relatifs aux acides aminés iodés étaient ceux de Hugues et Saunders [80] signalant brièvement une désiodation et une polymérisation de la DIT à propos de l'oxydation peroxydasique des dérivés halogénés de l'aniline, et de Solsona [160] décrivant la désiodation par une racine riche en peroxydase *(Raphanus sativus)* de la DIT et de la thyroxine, désiodation importante pour la première et très faible pour la seconde.

Depuis la publication de notre travail, Klebanoff [100] a étudié l'influence sur l'oxydation de l'adrénaline par la peroxydase et l'eau oxygénée, de la thyroxine et de phénols apparentés à la tyrosine et à la thyronine. Il a ensuite montré l'inactivation de l'œstradiol par la peroxydase [101].

2) **Tyrosinases.**

● L'étude de la tyrosinase et des réactions qu'elle peut induire par la formation de quinones à partir des mono- et des *o*-diphénols a donné lieu à de nombreux travaux, dont beaucoup sont exposés dans des articles généraux : Dawson et Tarpley [37] ; Lerner [106] ; Mason [125].

L'instabilité des quinones formées par l'enzyme, qui se polymérisent ou subissent des transformations très rapides, rend le milieu d'oxydation très complexe. L'analyse de ce milieu a pu être réalisée par les méthodes chimiques classiques (par exemple la condensation avec l'aniline de l'*o*-benzoquinone issue du catéchol [83, 146]), puis par la spectrophotométrie [123], enfin par la chromatographie et l'électrophorèse sur papier [16].

● Le schéma généralement adopté pour l'oxydation de la tyrosine *in vitro* en présence de tyrosinase est celui qui fut proposé par Raper [147]. (Fig. 1.)

Les mélanines synthétiques ainsi obtenues seraient des copolymères de l'indole-5,6-quinone et de l'acide indole-5,6-quinone-2-carboxylique, les unités pouvant se trouver à différents niveaux d'oxydation. Les points d'attache — 2, 3, 4, 7 — des unités entre elles ont été étudiés soit en suivant l'oxydation de dopa ou de 5,6-dihydroxyindole substitués en l'une de ces positions [34, cf. 125, 127] soit en déterminant les produits de dégradation de mélanines naturelles ou synthétiques [11, cf. 127, 137]. Certains auteurs [93] pensent que le rôle des dihydroxyindoles comme intermédiaires dans la mélanogénèse est insuffisamment démontré par l'isolement de leurs dérivés méthyliques [145] (car l'alcalinisation nécessaire à la méthylation peut avoir provoqué des altérations) ou par les comparaisons de spectres d'absorption [123] (car ceux-ci ne sont pas

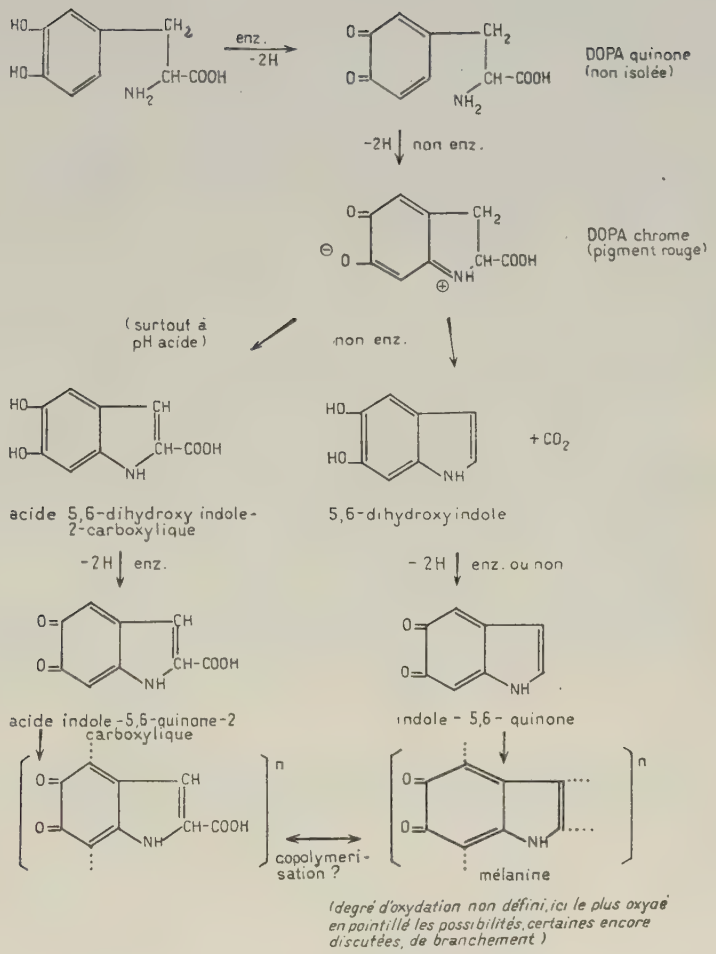


FIG. 1. — Schéma de la mélanogénèse (le passage de la tyrosine à la dopa n'a pas été représenté).

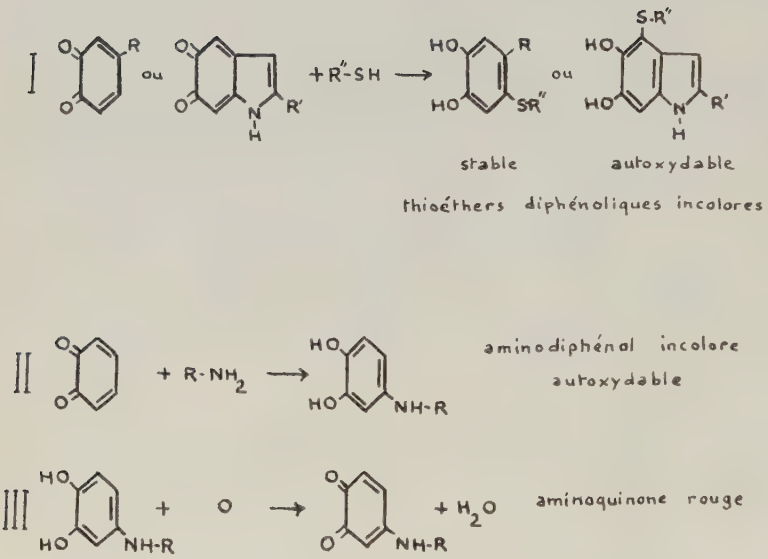


FIG. 2. — Réactions des quinones avec les thiols (I) et avec les amines (II et III).

absolument caractéristiques d'une substance). La constitution des mélanines naturelles (peau, cheveux, encre de seiche [138], etc...) n'est toujours pas élucidée en raison principalement de leur insolubilité et de leur résistance aux agents chimiques qui rendent difficiles leur purification et leur étude. En l'absence de connaissances précises sur la nature des pigments naturels, on tend actuellement à réserver le nom de « mélanines » aux pigments dérivés de la tyrosine et de la dopa, d'autres pigments pouvant être issus de catéchol, de tryptophane, ou même être formés de protéines tannées par différentes quinones (« scléroprotéines » étudiées par HACKMAN [68]).

● D'autre part nombreux sont les points encore obscurs à propos de la ppo et de son mode d'action sur les mono- et les diphénols. Cela tient aux difficultés de préparation de l'enzyme, dont les propriétés (par exemple le rapport des activités sur les monophénols et les diphénols) sont souvent modifiées au cours de la purification. De plus, l'enzyme de mammifères est lié à une structure subcellulaire, le granule mélanique ; cette structure est peut-être apparentée aux mitochondries, mais nettement distincte [6, 12, 163]. Ces dernières années, quelques enzymes très purifiés ont été obtenus, la plupart d'origine végétale [22, 23, 24, 54 *bis*, 97, 179, cf. 176].

Les points encore discutés sont relatifs en particulier :

— à la nature de la tyrosinase qui serait : soit un enzyme doué de deux activités, une sur les monophénols, une sur les diphénols ; soit un mélange de deux enzymes distincts (l'hypothèse la moins vraisemblable) ; soit une *o*-diphénolase conduisant des *o*-diphénols aux *o*-quinones : les monophénols seraient alors hydroxylés indirectement en présence de certains facteurs par les quinones ainsi formées à partir de traces de diphénols. Ce problème a été discuté en particulier par KERTESZ [91, 92, 97 *bis*] et par MASON [126] (cf. aussi : [10, 37, 59, 90, 143]).

— à la valence du cuivre dans l'enzyme « au repos » et dans l'enzyme « en action » [42, 43, 47, 95, 103].

● La tyramine (*p*-hydroxyphényléthylamine), l'adrénaline, la noradrénaline, peuvent subir *in vitro* en présence de ppo une oxydation tout à fait analogue à celle que nous avons décrite pour la tyrosine et la dopa [16, 33, 44, 60]. Le rôle de l'adrénochrome (correspondant au dopachrome) comme métabolite normal de l'adrénaline a été discuté, et son rôle physiologique étudié [60, 63, 171, 173, cf. 3, 152]. On pensait en effet que l'adrénaline pouvait agir au niveau des tissus sous cette forme, après intervention d'un système oxydant quelconque. Notons cependant que des expériences récentes [157] utilisant de l'adrénaline marquée par ^{14}C indiquent que l'importance de cette voie métabolique serait faible. Mais ces expériences ne sont pas suffisantes pour exclure qu'une certaine proportion de l'adrénaline synthétisée dans l'organisme ne soit transformée en adrénochrome. Les études sur les propriétés physiologiques de celui-ci, et sur celles de son dérivé, le trihydroxy-N-méthylindole, gardent donc leur intérêt.

Très tôt il fut noté que l'adrénochrome n'est plus un hypertenseur puissant comme l'adrénaline. DEROUAUX découvrit en 1939 ses propriétés hémostatiques [cf. 152]. D'autre part l'adrénochrome et le trihydroxy-N-méthylindole potentialisent les effets sur le muscle lisse d'une injection d'adrénaline ou de l'excitation du

sympathique (Travaux de Bacq, Fischer et Lecomte ; cf. [48, 49]). L'adrénochrome ajouté au liquide de perfusion de l'oreille de lapin empêche la disparition des effets vasomoteurs de l'excitation du sympathique au cou, disparition qui se produit en l'absence d'adrénochrome après excitations faradiques répétées [152]. Enfin Lerner [110] avait pensé, l'adrénaline étant bien oxydée par l'enzyme de mammifère en présence de dopa, que ses dérivés d'oxydation pouvaient entrer dans la composition des pigments de la peau. L'adrénochrome pris en faibles quantités par des volontaires humains produit chez eux, pour quelques heures, un état proche de la schizophrénie [cf. 137 *bis*].

Il faut remarquer qu'une grande partie des travaux ont utilisé l'enzyme végétal (de champignon ou de pomme de terre le plus souvent). Or l'enzyme présent dans les mélanomes de mammifères a une spécificité plus étroite [94, 110, 133, cf. 176] ; il agit relativement très peu sur les substrats autres que la tyrosine et la dopa, et n'attaque pas les peptides de tyrosine [24, 50, 94, 175]. La signification physiologique de l'oxydation par la ppo d'autres phénols que la tyrosine et la dopa s'en trouve limitée, mais ces substrats sont souvent intéressants comme points de comparaison.

Les mélanines naturelles sont associées à des protéines [62, 105, 159, 161, 162, 170, cf. 125] en même temps qu'à des métaux [18, 19, 20, 98, 105, 111, 161, 162, cf. 125] ; la détermination des liaisons chimiques pouvant intervenir a été tentée par plusieurs auteurs. Il existe deux possibilités pour qu'une protéine se trouve liée à un polymère mélanique. La première est l'oxydation par la ppo de restes de tyrosine inclus dans la protéine (Bibliographie dans [115 *bis*]) avec greffe en ce point d'autres unités quinoniques (provenant de tyrosine libre). L'oxydation de peptides ou de protéines contenant de la tyrosine a été récemment étudiée [54, 115 *bis*, 151 *bis*, 177, 178] avec un enzyme végétal et reconnue possible dans certains cas. Cependant il ne semble pas que l'enzyme de mammifères puisse accomplir une telle oxydation [cf. 176]. La deuxième possibilité est la fixation d'une molécule de quinone par réaction avec un groupement sulfhydryle ou amine de la protéine, avec ensuite greffe d'autres unités quinoniques. Les fonctions quinones de la mélanine déjà formée pourraient elles-mêmes théoriquement réagir avec ces mêmes groupements inclus dans la protéine.

On sait que l'*o*-benzoquinone se combine avec les amines simples et les acides aminés [cf. 125]. L'azote de la fonction aminée se fixe sur le noyau aromatique en *para* de l'une des fonctions quinoniques (cf. Réactions II et III, fig. 2). L'*o*-benzoquinone peut se combiner à des groupements amines inclus dans des protéines [124, 129]. La dopaquinone par contre ne se combine qu'aux amines aromatiques (absentes des chaînes protéiques) et non aux acides aminés [58, 127]. L'*o*-benzoquinone se combine aussi aux thiols simples [cf. 127] de même que les quinones dérivées des flavanols [149]. Mason et Peterson avaient conclu [130] d'expériences non publiées que la dopaquinone et le dopachrome ne réagissaient pas avec les thiols, mais que l'indolequinone se combinait au glutathion et aux protéines contenant des -SH. D'autre part, Burton et Stoves [31] pensaient que des dérivés du 1,2,4-trihydroxybenzène pouvaient réduire les ponts disulfures de la kératine en se transformant en quinones, capables de s'additionner ensuite aux groupement -SH libérés. Il

paraissait donc probable que l'indolequinone se combinerait aux -SH protéiques pour donner une mélanine liée à la protéine par une covalence.

Une grande partie des connaissances que nous possédons sur la combinaison de quinones aux protéines ont été acquises au cours de recherches sur les cuticules d'insectes, où des ppo induisent le durcissement et la pigmentation de l'exocuticule protéique. Cette question a été longuement étudiée (Bibliographie dans [40, 56, 68 *bis*, 125]). On a montré récemment que ces deux processus sont distincts [89, 122]. Le durcissement serait dû au « tannage » des protéines par des quinones : *o*-benzoquinone ou quinones dérivées des acides dihydroxyphényl-lactique ou -acétique et de l'acide dihydroxybenzoïque pour certains [69], *p*-benzoquinone pour DENNELL et son école [40]. La pigmentation précéderait le durcissement [122]. Elle serait due soit à la polymérisation de l'*o*-benzoquinone [89] ou des *o*-quinones dérivées des acides énumérés ci-dessus [68], soit [40] à la formation de mélanines indoliques à partir de dopa, elle-même issue de la tyrosine par oxydation dans le sang de l'insecte. Selon DENNELL [38, 39], la phénylalanine et la tyrosine seraient hydroxylées par un système non spécifique, conduisant entre autres à du catéchol et à de l'hydroquinone (1,4-dihydroxybenzène).

Le « tannage » correspondrait à une combinaison des quinones aux fonctions amines libres des protéines. Au sujet d'un rôle éventuel des fonctions thiols, notons que d'après HACKMAN [66, 67, 68] les protéines cuticulaires des insectes sont pratiquement dépourvues de soufre. Seules la fraction protéique insoluble dans l'eau et soluble dans les alcalis dilués en contient (environ 0,3 %).

Ces travaux ont résolu plusieurs questions relatives aux combinaisons de diverses quinones aux groupements amines ou thiols ; mais de telles combinaisons n'ont jamais été démontrées pour la dopaquinone et l'indolequinone, qui nous intéressent directement ici, si ce n'est dans les expériences non publiées de MASON et PETERSON [130] pour l'indolequinone et les protéines sulfhydrylées. HACKMAN et TODD [70] constatant qu'une protéine cuticulaire soluble dans l'eau devenait insoluble après une semaine passée au contact de ppo et de dopa, concluaient que la dopaquinone formée avait tanné la protéine. Nous verrons que nous pouvons proposer une autre explication à la lumière de nos propres expériences.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

A) SUBSTANCES MISES EN ŒUVRE (*)

1° La plupart sont des produits commerciaux :

— Hoffmann-La Roche : L-tyrosine ; 3,4-dihydroxy-L-phénylalanine ; glutathion et glutathion oxydé ; DL-thyronine ; 3,5-diiodo-DL-tyrosine ; DL-thyroxine (3, 5, 3', 5'-tétraiodothyronine) ; sulfate d'hordénine.

— Fluka A.G. Chemische Fabrik : Chlorhydrate de 3,4-dihydroxyphényléthylamine (dopamine, hydroxytyramine) ; chlorhydrate de l-noradrénaline ; l-adrénaline et son chlorhydrate.

— Prolabo : catéchol (1,2-dihydroxybenzène) recristallisé deux fois dans l'eau au laboratoire ; chlorhydrate de cystéine ; 2,4- dinitrophénylhydrazine ; réactifs « pour analyses » : acide sulfurique concentré (D = 1,83), acide chlorhydrique concentré (D = 1,19), ammoniaque concentrée (D = 0,925).

— Aldrich Chemical Co. Inc. : 3- et 4-méthylcatéchols ; dans les expériences de ces dernières années : 3-monoiodo-L-tyrosine et sel de sodium de 3,5,3'-triiodo-DL-thyronine.

— Sigma Chemical Company : sérumalbumine de bœuf.

— Nutritional Biochemical Corporation : ovalbumine. La teneur en groupements -SH de l'ovalbumine a été vérifiée par la méthode de Boyer [21]. Pour la sérumalbumine, les -SH sont en nombre trop faible par rapport aux acides aminés aromatiques pour que ce dosage spectrophotométrique soit praticable sans un matériel spécial.

2° Ont été synthétisés au laboratoire, pour des recherches antérieures aux nôtres :

3'-hydroxy-DL-thyronine [15]
3-monoiodotyrosine
3- et 3'-monoiodo-DL-thyronines [150, 151]
3,5,3'-triiodo-DL-thyronine
Adrénochrome [74].

Vu la faible solubilité dans l'eau des thyronines iodées aux pH proches de la neutralité, nous avons souvent fait agir les enzymes sur des suspensions de ces substances plutôt que sur des solutions.

3° Enfin, nous avons préparé au cours de notre travail de l'oxyde d'argent selon la méthode de Helferich et Klein [76], du 5,6-dihydroxyindole soit à partir de 5,6-diacétoxyindole selon Beer [8] soit à

(*) Abréviations p. 83. Formules p. 83 ; cf. aussi fig. 1.

partir de dopa oxydée par Ag_2O, des tyrosines ou thyronines iodées marquées par ^{131}I, et de la 3-hydroxyhordénine.

Préparation de 5,6-dihydroxyindole à partir de dopa.

Le mode opératoire suivi dans nos premières préparations [17] a été modifié pour obtenir un meilleur rendement : 11 mg d'Ag_2O sont mis en suspension dans 3 ml de tampon phosphates 0,1 M de pH 6,0 et on ajoute 6 ml d'une solution aqueuse de dopa 5 mM. Après 5 minutes d'oxydation, on filtre sur filtre Durieux bleu (5 minutes pour la filtration). Le filtrat rouge franc intense est versé dans un tube de THUNBERG. On fait le vide à l'aide d'une pompe à palettes jusqu'à ce que le liquide entre en ébullition. On laisse à 4°C et à l'obcurité. Après 48 heures le liquide est encore rouge, mais contient assez de DHI pour qu'on puisse l'utiliser ; on peut aussi attendre quelques jours pour une transformation plus complète du dopachrome. Le DHI est extrait par de l'éther, et la solution éthérée est déposée sur papier W_1 lavé pour faire une séparation chromatographique en eau. Après un bref séchage, on repère la bande d'intense fluorescence bleu-mauve (Rf. 0,40 environ) ; on la découpe en portions de 3 à 4 cm de long pour que l'élution par l'eau, effectuée à l'obscurité, soit plus rapide. On recueille un volume total de 3 à 5 ml. La concentration de l'éluat est calculée d'après la densité optique à 298 mμ [34]. Cette solution n'est pas très stable, même à 4°C et à l'obscurité.

Préparation des tyrosines et thyronines iodées marquées par ^{131}I.

La technique employée est celle que décrivent LISSITZKY et ROQUES [116]. Une solution dans l'ammoniaque concentrée de l'acide aminé à ioder (volume environ 0,5 ml) est agitée en présence d'une solution chloroformique de $^{127}I_2$ et ^{131}I-^{127}I, obtenue par échange en agitant 10 minutes une solution chloroformique de $^{127}I_2$ (0,6 ml) avec une solution aqueuse (0,6 ml) de $Na^{131}I$ sans entraîneur ni réducteur et amenée à pH compris entre 5 et 6. Le nombre d'atomes d'iode mis en œuvre par molécule d'acide aminé dépend du nombre de substitutions souhaitées. Le mélange est agité de temps à autre pendant 30 minutes. La solution ammoniacale est alors prélevée et déposée sur papier Whatman 3 mm. La séparation se fait en BA pour MIT et DIT, en AA pour les thyronines iodées. Les substances sont repérées par radioautographie. Les élutions sont effectuées par de l'acide acétique 0.01N pour MIT et DIT, par NH_4OH 2N ou par du méthanol contenant 1 % d'ammoniaque, pour les thyronines iodées. L'éluat est évaporé dans un exsiccateur et remis en solution au pH choisi selon le cas.

On n'iode par cette méthode que les positions 3 et 5 de la Tyr, et 3' et 5' de la Thy.

On calcule l'activité spécifique de l'acide aminé iodé et sa concentration dans la solution obtenue d'après la radioactivité de la solution de $Na^{131}I$, la quantité d'I_2 contenu dans la solution chloroformique et la radioactivité de la solution de l'acide aminé iodé.

Nous avons aussi utilisé de la 3,5,3'-T_3 et de la T_4 radioactives préparées par Abbott Laboratoires (U.S.A.), après une purification par chromatographie sur papier et élution.

Préparation de la 3-hydroxyhordénine.

A partir de sulfate d'hordénine nous avions voulu obtenir la quinone correspondant à la 3-hydroxyhordénine, particulièrement intéressante pour nous parce que son azote est disubstitué par des

groupements méthyles. On pouvait s'attendre à obtenir ainsi une quinone monocyclique relativement stable, ayant peu tendance à se cycliser pour donner des dérivés dihydroindoliques du type aminochrome. Or l'oxydation de l'hordénine par la ppoKZ de champignon ne conduit pas à cette *ortho*-quinone ; l'action de l'enzyme s'arrête paradoxalement à la formation de l'*ortho*-diphénol, vérifiée par l'étude des modifications spectrales — le maximum passe de 274 mμ (contrefort à 280 mμ) à 285 mμ avec une densité optique environ trois fois plus élevée — et par la chromatographie. A 37°C, sans agitation mécanique, mais avec une bonne aération, 1 ml de sulfate d'hordénine 5 mM dans l'eau est oxydé par 5 μl de ppoKZ en quelques heures. La disparition d'hordénine est suivie grâce à sa réaction avec l'α-nitroso-β-naphtol (coloration rouge fugace) après séparation chromatographique en BA. Parallèlement à cette disparition du monophénol, on note l'augmentation de l'intensité d'une tache de Rf plus faible, révélée par NO_3Ag am. et se colorant en jaune comme la dopa par l'α-nitroso-β-naphtol : c'est l'hydroxyhordénine. Le spectre ultraviolet du milieu oxydé contenant l'*o*-diphénol reste stable pendant 24 h., et ne présente pas le maximum caractéristique des *o*-quinones (voir plus loin), ce qui montre que l'oxydation s'arrête au stade de l'hydroxyhordénine au moins pour la presque totalité des molécules.

Pour obtenir la quinone, nous avons réalisé une oxydation par PbO_2 (voir plus loin) de ce milieu d'oxydation par la ppo, contenant l'*o*-diphénol.

4° L'eau que nous utilisons dans toutes nos expériences est une eau désionisée distillée deux fois dans un appareil en Pyrex ou en quartz.

B) CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER.

● Nous utilisons le plus souvent du papier Whatman 1 (ou W_1) parfois du Whatman 3 mm, plus épais, pour des séparations préparatives ; enfin quelquefois du Whatman 4. Le papier commercial contient plusieurs impuretés dont des bisulfites et des métaux (cuivre en particulier). Ces impuretés sont souvent gênantes pour les substances qui nous intéressent. Nous les avons éliminées en grande partie en lavant le papier par de l'acide acétique 2N, puis par de l'eau jusqu'à disparition de l'acide acétique. Pour réaliser ces lavages, le papier est traversé par le solvant comme pour une chromatographie descendante, et le solvant s'écoule par des dentelures découpées préalablement sur le bord inférieur. Ce papier lavé est utilisé pour séparer les substances fragiles.

● Dans la plupart des cas, la chromatographie descendante nous donne de bons résultats. Pour les solvants à base de méthyléthylcétone, nous préférons la technique ascendante.

● Nous avons utilisé divers mélanges comme solvants de développement :

— Butanol acétique ou BA : *n*-butanol 78 ml, acide acétique cristallisable 5 ml, eau 17 ml ; le mélange est homogène.

— Amylol ammoniacal ou AA : amylol tertiaire 180 ml, ammoniaque concentrée 30 ml, eau 150 ml ; utiliser la phase supérieure. L'AA est utile pour séparer les thyronines iodées.

— Pour la séparation des différents produits colorés obtenus dans l'action de la dinitrophénylhydrazine sur les milieux d'oxydation des phénols, nous avons eu recours à l'éthanol chlorhydrique (éthanol 20 ml, acide chlorhydrique 21,5 ml).

— Méthyléthylcétone acétique (ou MECA) et formique (ou MECF) nous ont servi dans l'étude de l'oxydation des phénols en présence de glutathion ou de cystéine ; leur composition est la suivante : méthyléthylcétone redistillée (ou parfois technique) 75 ml, acide acétique ou formique 25 ml, eau 30 ml ; le mélange est homogène.

— Enfin l'eau, solvant de développement peu employé actuellement, se révèle très utile, surtout dans la recherche ou la préparation de substances fragiles (aminochromes par exemple). Un autre cas où l'eau se trouve particulièrement intéressante est la chromatographie bidimensionnelle des milieux d'oxydation des thyronines iodées par la peroxydase : on sépare ainsi très facilement les iodures et les iodotyrosines, solubles dans l'eau, des dérivés des thyronines iodées ou des polymères, peu solubles. Il faut remarquer que les Rf dans l'eau ne sont pas très constants. Il est bon de placer des témoins pour identifier les spots sans hésitation. On peut même avoir dans certaines conditions changement dans l'ordre de migration de deux composés l'un par rapport à l'autre : sur papier W_1 la MIT migre moins loin que la DIT ; mais sur W_1 lavé ou en deuxième dimension après du BA, l'ordre est inversé ; le papier qui a été traversé par un solvant à l'acide acétique a un comportement différent, soit par élimination d'impuretés, soit par modification des groupements ionisables de sa trame. D'autre part, la présence de sels dans les essais perturbe les Rf les plus élevés.

● Nous devons aussi donner quelques précisions à propos du dépôt des prises d'essais sur le papier. Le plus souvent nous activons le séchage par un courant d'air tiède : 40° C ou 50° C au maximum pour éviter les altérations dues à la chaleur (un séchoir à cheveux est placé à distance convenable de la feuille de papier). La durée de cette opération est importante, ainsi que le temps qui s'écoule avant que le chromatogramme ne soit mis à développer. Lorsqu'on dépose par exemple un milieu d'oxydation de dopa par Ag_2O, rouge, la tache de dépôt pâlit nettement et devient de plus en plus grise par transformation du dopachrome initialement présent en dérivés indoliques et mélanine. Au contraire, si l'on dépose très rapidement un milieu contenant du dopachrome, mais pas encore de dérivés indoliques (début d'oxydation par la ppo par exemple) et si l'on fait immédiatement la migration dans l'eau, on obtient des chromatogrammes d'où les dérivés indoliques sont absents.

Cependant même en opérant rapidement, l'action de la ppo n'est pas négligeable pendant le dépôt des prises d'essais. C'est pourquoi, si l'on veut comparer les quantités d'*o*-diphénol présentes avant et après l'addition d'un réducteur dans le milieu d'oxydation, il est nécessaire d'inactiver l'enzyme par acidification, et d'ajouter le réducteur dans une portion du milieu ainsi traité. Sinon l'enzyme agirait en diminuant la quantité de diphénol dans l'essai non réduit.

Une autre observation illustre les précautions à prendre pour l'analyse chromatographique : c'est la formation d'un composé inconnu lorsqu'une solution de dopa est déposée sur papier W_1 et laissée quelques heures à l'air avant la migration. Ce composé nouveau d n'est pas décelé en BA car il a alors le même Rf que la dopa. Par contre, en eau son Rf est nettement inférieur. Il se forme aussi sur W_1 lavé mais en quantité plus faible, et sensiblement en même quantité que le dépôt soit séché à froid ou à chaud. Ce composé d n'est plus un α-aminoacide car il donne par la ninhydrine une coloration jaune. C'est un phénol (réactif de PAULY), probablement un *ortho*diphénol (NO_3Ag am.). Il ne donne pas la réaction d'EHRLICH.

D'après la migration faible en électrophorèse et l'absence d'action sur le vert de bromocrésol, il n'est ni nettement acide, ni nettement basique. En solution dans l'eau, il présente un maximum d'absorption à 283 mμ. Il est oxydé par la ppo en donnant un pigment rose différent du dopachrome.

Sur du papier W_1 ordinaire, il se forme à côté de d un pigment violet de Rf 0,94 en eau. Ce pourrait être une combinaison de d avec une impureté métallique du papier, car il est de mieux en mieux visible au cours de la migration ; de plus lorsqu'une solution pure de ce pigment migre en eau sur papier W_1 lavé la coloration violette disparaît peu à peu et l'on retrouve d comme produit principal de cette décomposition. Le pigment violet présente un maximum à 287 mμ et un vers 550 mμ. Il est oxydé par la ppo (coloration violet-rose). Il donne une coloration jaune avec le réactif d'Ehrlich (comme la dopa) et ne réagit pas avec la ninhydrine. Un pigment violet se forme dans les mêmes conditions à partir de dopamine.

● Enfin la chromatographie d'essais contenant de l'acide sulfurique (dans la recherche des quinones monocycliques par régénération du diphénol disparu au cours de l'oxydation) présente des difficultés particulières. Seule la dopa, corps amphotère, donne alors un spot bien net après migration dans l'eau. La chromatographie des amines diphénoliques basiques est plus délicate, car elle est perturbée par les acides [cf. 132]. On obtient néanmoins des taches allongées dont on peut comparer l'intensité de façon suffisamment certaine lorsque la consommation du diphénol et sa régénération ultérieure sont importantes ; on peut ainsi avoir des taches apparemment trois ou quatre fois plus intenses après qu'avant réduction (révélation par NO_3Ag am.).

● Une fois développés, les chromatogrammes sont séchés dans un courant d'air froid. Les taches pigmentées sont notées, ainsi que les taches fluorescentes en lumière de Wood (lampe Philips HPW 125).

● Ils sont révélés par l'un des réactifs suivants :

— Ninhydrine à 0,2 % dans l'acétone — par trempage — pour les α-aminoacides.

— Nitrate d'argent 0,1 N ammoniacal ou NO_3Ag am.. Les substances réductrices apparaissent sous forme de plages grises ou brunes. Pour préparer ce réactif, ajouter à du nitrate d'argent 1 N de l'ammoniaque concentrée en léger excès par rapport à la quantité nécessaire pour redissoudre le précipité formé en premier lieu ; compléter avec de l'eau pour arriver à la normalité 0,1 N. Les chromatogrammes révélés par ce réactif noircissent rapidement. Pour conserver des documents lisibles, nous avons lavé à l'eau désionisée (jets de pissette, sur le papier suspendu) les chromatogrammes cinq ou dix minutes après la pulvérisation du réactif. Si ce lavage est fait soigneusement le fond reste assez clair indéfiniment. Les *o*-diphénols et les *p*-diphénols donnent très rapidement des taches grises ou noires, parfois brunes ; les monophénols ne réagissent pas ; les *para*-diphénols dont une fonction est bloquée sous forme de pont phényl-éther (exemple : thyronine) réagissent lentement, plus faiblement, et donnent des taches brunes. Les phosphates donnent une coloration jaune qui vire au gris en quelques minutes.

— Acide phosphomolybdique à 5 % dans l'eau. Par pulvérisation ; puis exposition à des vapeurs d'ammoniac. Les substances très réductrices, dont les *o*-diphénols, donnent la coloration bleue immédiatement après la pulvérisation. Les monophénols réagissent faiblement.

— Réactif de Pauly (diazoïque de l'acide sulfanilique). La solution stock se prépare en dissolvant 0,9 g d'acide sulfanilique dans 100 ml d'eau et en ajoutant 9 ml d'acide chlorhydrique concentré. A 1,5 ml de cette solution placé dans un bain de glace on ajoute

goutte à goutte 1,5 ml d'une solution fraîche de nitrite de sodium à 5 %, puis encore 6 ml de cette solution de nitrite et enfin 50 ml d'eau. Le diazoïque ainsi préparé peut être conservé quelques jours à 4°C. On pulvérise sur le chromatogramme à révéler ce réactif, puis du carbonate de sodium à 2,5 %. Les phénols forment des azoïques différemment colorés.

— Réactif d'EHRLICH. 1 g de *p*-diméthylaminobenzaldéhyde dissous dans 14 ml d'acide chlorhydrique concentré. Compléter à 100 ml par du *n*-butanol saturé d'eau. Se conserve très bien à 4°C. Utilisé par pulvérisation. Les dérivés indoliques qui nous intéressent sont révélés en bleu ou vert. La dopa donne une coloration jaune.

— α-nitroso-β-naphtol à 0,1 % dans l'éthanol (se conserve à 4°C) puis acide nitrique à 10 % (par pulvérisation). Après chauffage à 100°C, les phénols substitués en *para* dont les deux positions *ortho* sont libres donnent des taches roses fugaces ; l'hydroxyhordénine et la dopa (une seule position *ortho* libre) donnent des taches jaunes. Fond jaune pâle.

— Réactif d'ARNOW. Mélanger extemporanément 0,5 ml d'une solution à 20 g de nitrite de sodium et 20 g de molybdate de sodium ou d'ammonium pour 100 ml d'eau, 1 ml de HCl 2N et 18,5 ml d'eau. Pulvériser. Sécher à 60°C. Pulvériser de la soude 2N. Sécher à 60°C. Révèle les *o*-diphénols en rose ou orangé. La thyronine donne une coloration jaune.

— Iodure de potassium, acide sulfurique 2N et empois d'amidon (mélange extemporané). Par pulvérisation. Révèle les substances oxydantes : coloration bleue.

— Solution de vert de bromocrésol ou d'hélianthine. Par trempage. Pour révéler les plages de différents pH.

— Réactif cérique. Révèle en blanc sur fond jaune les composés iodés organiques ou minéraux. A 0,8 ml d'une solution d'anhydride arsénieux (5 g) dans la soude à 30 % (7 ml) on ajoute extemporanément 10 ml d'acide sulfurique 1N et 10 ml d'une solution de sulfate cérique (préparée en triturant longuement 10 g de sulfate cérique pour 100 ml d'acide sulfurique 1N, en laissant décanter et en filtrant sur filtre Durieux bleu n° 111). De ce mélange on imprègne une feuille de papier W_1 ou Arches 302 coupée aux dimensions du chromatogramme et posée sur une plaque de verre. Cette feuille est nommée « négatif ». On pose sur cette feuille le chromatogramme que l'on maintient par une deuxième plaque de verre. On laisse en contact 5 à 30 minutes selon la quantité d'iode présente. L'iode catalyse la réduction par l'arsénite du sulfate cérique jaune en sulfate céreux blanc. Les phosphates donnent aussi des taches blanches, mais plus faibles et qui ne se trouvent en général pas sur le « négatif ». Les taches blanches sont stables, mais le papier finit par s'effriter à cause de l'acide sulfurique. Nous avons neutralisé cet acide après avoir marqué les taches au crayon en trempant les chromatogrammes dans une solution saturée de bicarbonate de sodium, puis dans l'eau ordinaire. Nous obtenons ainsi des documents qui se conservent sans dommage.

— Solution de ppoKZ diluée. Par pulvérisation, comme réactif très spécifique de certains phénols.

• Les substances radioactives sont révélées par radioautographie : le chromatogramme est appliqué contre un film Kodak sans écran pendant un temps variable selon la radioactivité.

C) ELECTROPHORESE SUR PAPIER.

Une feuille de papier Whatman 1 humectée de tampon, sur laquelle ont été déposées les prises d'essai, est placée sur un support horizontal, ses extrémités plongeant verticalement dans deux bacs remplis de tampon et recevant les électrodes. La longueur de papier comprise entre les deux bacs est de 25 cm. La tension appliquée est de 480 à 500 volts. L'intensité est de 0,75 mA par cm de largeur (17 mA pour 23 cm). Durée 2 à 6 h. Selon le cas le tampon employé varie : acétate d'ammonium 0,2 à 0,5 M, pH 6,2 à 6,8 ; sesquicarbonate d'ammonium 0,05 M, pH 8,6.

La révélation s'effectue comme pour un chromatogramme.

Pour l'électrophorèse des essais contenant des protéines ou du sérum, nous utilisons du papier 3 mm, un tampon véronal 0,025 M de pH 8,6, 400 volts pour 20 cm de longueur, et 5 mA pour 12 cm de largeur pendant 5 h. Nous utilisons aussi d'autres tampons : phosphates pH 6,5 de force ionique 0,1 (KH_2PO_4 3,11 g et Na_2HPO_4 1,49 g par litre ; 400 volts ; 5 h.) ; tris-maléate 0,1 M pH 8,6 (250 ml d'une solution à 24,2 g de tris(hydroxyméthyl)aminométhane et 23,22 g d'acide maléique par litre, ajustés à pH 8,6 avec NaOH1N et portés à un litre ; 140 volts ; 16-18 h.) ; tris-borate-EDTA 0,5 M pH 8,9 (tris(hydroxyméthyl)aminométhane 60,5 g, acide borique 4,6 g, éthylènediaminetétraacétate 6,0 g par litre ; 130 volts ; 16 h.).

La révélation des protéines s'effectue soit par le bleu de bromophénol (dissoudre 10 g de bichlorure de mercure dans 100 ml d'éthanol à 95° et ajouter 0,1 g de colorant) pendant 3 minutes puis lavage à l'eau ordinaire, soit par le noir amide ou Amidoschwarz (Bender und Hobein) : tremper le papier à révéler 5 à 10 minutes dans une solution saturée de noir amide (2 g pour 200 ml) dans du méthanol acétique (méthanol 180 ml, acide acétique 20 ml) ; puis dans du formol acétique (formol 50 ml, acide acétique 100 ml, eau qsp 1.000 ml) jusqu'à décoloration presque totale du fond ; terminer la décoloration du fond par méthanol 5 vol., acide acétique 1 vol., eau désionisée 5 vol.

D) OXYDATION PAR L'OXYDE D'ARGENT Ag_2O.

On ajoute à la solution de diphénol tamponnée ou non par un tampon phosphates de pH 6,8, la quantité d'Ag_2O nécessaire pour obtenir l'aminochrome, c'est-à-dire correspondant à deux atomes d'oxygène par molécule (6,96 mg pour 3 ml de solution 5 mM). En fait on n'obtient pas l'aminochrome pur, car il se transforme peu à peu en dérivés indoliques. On arrête l'oxydation en filtrant sur filtre Durieux bleu n° 111, après un temps variable — 3 à 20 min. — selon qu'on préfère une grande quantité d'aminochrome même accompagné de dérivés indoliques et de leurs produits d'oxydation, ou qu'on veut éviter ces derniers.

E) OXYDATION PAR L'OXYDE DE PLOMB PbO_2.

Notre méthode est dérivée de celle que RANGIER [144] a décrite. La solution 5mM de diphénol dans l'eau est additionnée d'acide sulfurique concentré de façon à obtenir une acidité finale 1N. On ajoute (temps zéro) de l'oxyde de plomb en large excès (quantités extrêmes utilisées : 100 et 800 mg pour 3 ml de solution 5mM, sans

changement sensible pour le résultat). Après 30 à 60 secondes, on commence la filtration sur filtre Durieux bleu plissé, filtration arrêtée au temps 2,5-3 minutes. Les dilutions éventuellement nécessaires sont faites dans l'acide sulfurique 1N pour maintenir la même acidité. La méthode ainsi modifiée permet de réduire le temps de préparation, ce qui est capital pour des corps aussi instables (*o*-quinones monocycliques) même en milieu très acide. En utilisant la filtration plutôt que la centrifugation on obtient une élimination plus complète de l'agent oxydant, et l'on peut supprimer l'emploi de chlorure de baryum. Or l'ion Cl^- donne avec PbO_2 du chlore naissant, qui peut agir comme oxydant après la filtration, et comme chlorurant. Dans nos premières expériences, nous avons ajouté de la baryte pour mieux rassembler l'oxyde de plomb ; nous avons vu ensuite que cela n'était pas nécessaire.

F) OXYDATION PAR LES PEROXYDASES.

1° Peroxydase de raifort :

C'est un enzyme commercial. Après l'essai d'une peroxydase vendue par Bios Laboratories qui s'est révélée peu active, la peroxydase de Worthington Biochemical Corporation (PN = 450) nous a donné satisfaction. Nous avons employé une solution à 0,1 % préparée en triturant au mortier d'agathe la poudre enzymatique avec de l'eau, et ses dilutions au dixième et au centième, car les quantités d'enzyme nécessaires sont extrêmement variables d'un donateur d'hydrogène à un autre. Ces solutions peuvent être conservées plusieurs semaines à 4°C sans changement sensible de leur activité sur la thyronine. Les solutions d'eau oxygénée à 1 % et 0,02 % sont préparées à partir de perhydrol Merck et conservées à l'obscurité à 4°C. Leur stabilité est variable. Il faut les doser de temps en temps (permanganate de potassium en milieu acide).

La réaction s'effectue à température ordinaire, et à des pH variables : soit dans l'eau sans tampon, soit en présence de tampon phosphates (pH de 6 à 6,8), ou de tampon carbonate d'ammonium (pH 8,5).

Elliott [45] insistait sur la nécessité d'ajouter l'eau oxygénée par petites fractions pour ne pas inactiver la peroxydase. Après avoir procédé selon sa méthode, ajoutant l'eau oxygénée avec une burette au mélange de thyronine et de peroxydase, nous avons essayé l'addition de l'eau oxygénée en une seule fois, et nous avons constaté que la réaction a lieu aussi bien. Même pour des essais où la concentration en eau oxygénée ($[H_2O_2]$) est 52 mN la thyronine est consommée et il apparaît les mêmes produits de réaction. Par exemple, aucune inhibition n'est sensible lorsqu'on passe de $[H_2O_2]$ = 0,45 mN, [Thy] = 1,9 mM, 190 µg d'enzyme par ml, à $[H_2O_2]$ = 1,96 mN, [Thy] = 1,67 mM, 167 µg d'enzyme (une heure de réaction ; précipité blanc ramassé au fond des tubes), ou lorsqu'on passe de $[H_2O_2]$ = 11,3 mN, [Thy] = 2,4 mM, 0,24 µg d'enzyme par ml à $[H_2O_2]$ = 52 mN, [Thy] = 2,2 mM, 0,22 µg d'enzyme (10 min. de réaction ; essais très troubles). Au contraire, dans chacune de ces deux séries d'essais, la concentration la plus grande en H_2O_2 correspond à la plus grande consommation de thyronine (estimée après chromatographie sur papier).

Un témoin sans enzyme où $[H_2O_2]$ = 168 mN et [Thy] = 1,43 mM montre que l'eau oxygénée à cette forte concentration attaque la thyronine en donnant au bout de 48 h. un peu de tyrosine et une certaine quantité d'un composé révélé par NO_3Ag am. de Rf 0,8 en BA comme l'hydroquinone (1,4-dihydroxybenzène).

Dans la plupart de nos expériences, la concentration de l'eau oxygénée est de l'ordre de 4 mN ; le rapport de l'eau oxygénée au donateur d'hydrogène est d'environ une mole par mole, sauf pour les thyronines portant plus d'un atome d'iode car leur faible solubilité nous oblige à réduire leur concentration, alors que nous utilisons toujours la même quantité d'eau oxygénée. Ces détails seront indiqués pour chaque expérience au moment d'en exposer les résultats.

2° **Myéloperoxydase :**

C'est une solution enzymatique envoyée par KLEBANOFF [100], que nous remercions vivement. Ignorant si l'enzyme reçu avait déjà subi la dialyse préconisée par cet auteur, nous avons comparé son activité avant et après dialyse contre de l'eau à 4°C. L'enzyme est un peu plus actif (sur la thyronine) après dialyse ; la différence n'est pas grande, mais nous avons préféré utiliser l'enzyme dialysé pour nos expériences. L'enzyme a dû être inactivé en grande partie au cours du transport ; en effet il ne présentait que la trois millième partie environ de l'activité de la solution à 0,1 % de peroxydase de raifort sur la thyronine.

Nous avons utilisé 0,2 ml d'enzyme pour 1 ml de thyronine 2,5 mM, les autres conditions étant semblables à celles que nous avons décrites pour la peroxydase végétale. A pH 7,4 la myéloperoxydase semble un peu plus active qu'à pH 6,8 ou 5,7.

Pour 1 ml de 3,5,3'-T_3 0,25 mM nous avons employé 0,2 ml d'enzyme, soit en présence de tampon phosphates de pH 7,4 soit en l'absence de tampon. Pour 1 ml de DIT 2,5 mM, 0,1 ml d'enzyme à pH 7,4.

G) OXYDATION PAR LES TYROSINASES.

1° **Mélanome de souris de** HARDING-PASSEY :

— Nous avons utilisé une poudre obtenue par lyophilisation à partir du tissu frais (préparée par KERTESZ que nous remercions pour ce don). En triturant 10 minutes cette poudre dans un mortier d'agathe avec de l'eau ou un tampon phosphates 0,1 M (pH entre 6,4 et 7,4) nous obtenons une suspension (50 ou 100 mg de poudre par ml) que nous utilisons telle quelle. Pour obtenir un extrait acellulaire, nous traitons la poudre par la moitié du solvant, nous centrifugeons 5 min. à 5.000 tours/min. ; nous triturons de nouveau au mortier le culot avec le reste du solvant. Nous centrifugeons de la même façon et nous réunissons les deux surnageants. Or le culot de la deuxième centrifugation remis en suspension dans une quantité de solvant équivalente à celle de l'extrait acellulaire présente une activité sur la thyronine égale à celle de l'extrait acellulaire lui-même. Nous en concluons que notre méthode extrait environ 50 % de l'activité sur la thyronine de la poudre mise en œuvre. D'un autre côté, la transformation des iodures en composés iodés inconnus de

Rf élevé en BA, provoquée par le mélanome est moins active dans les extraits acellulaires que dans le culot résiduel remis en suspension.

— *Analyse chromatographique du mélanome.* — Après migration en BA, un témoin de mélanome révélé par la ninhydrine présente plusieurs taches, ce qui est normal puisqu'il s'agit d'une préparation brute. Certaines ont parfois la même Rf que la thyronine, la 3'-hydroxythyronine, la tyrosine ou la dopa. De plus, quelques-unes augmentent pendant l'incubation à 37°C du mélanome dans l'eau ou le tampon phosphates pendant quelques heures. Il faut donc un témoin réalisé chaque fois dans les mêmes conditions que l'essai pour conclure à l'apparition dans ce dernier de tyrosine due à la rupture du pont phényléther de la thyronine. Nous avons vérifié par chromatographie bidimensionnelle — BA puis MECA — qu'une suspension de mélanome incubée à 37°C à pH 6,6 pendant 90 min. ne contient ni thyronine, ni hydroxythyronine, ni α-amino acide ayant leur Rf dans ces conditions.

— Pour réaliser une oxydation par le mélanome, nous ajoutons à 1 ml de substrat dissous dans l'eau ou dans un tampon phosphates 0,1 M, 0,5 ml de suspension enzymatique ou d'extrait acellulaire (les solutions de Thy et de 3-T_1 sont 2,5 mM ; les solutions des autres thyronines iodées sont moins concentrées car il avait été trouvé [113, 114] que la ppoKZ ne les attaquait que dans ces conditions). Les essais sont agités mécaniquement dans un thermostat à 37°C. Dans la plupart des cas la durée des expériences est de l'ordre de une heure. Nos premières expériences [115] ont été réalisées dans des erlens de 50 ml bouchés par un bouchon de caoutchouc traversé par une canne de verre pour éviter une évaporation importante. Ensuite nous avons disposé de fioles à ouvertures rodées adaptables aux manomètres d'un appareil de Warburg jouant le rôle de supports.

— *Conservation.* — Des extraits acellulaires de pH 6,8 gardés à 4°C pendant une semaine conservent leur activité sur la thyronine. Cependant nous avons préféré préparer l'enzyme au moment de son emploi ; dans quelques cas nous avons utilisé une préparation conservée un ou deux jours à 4°C.

2° **Enzyme du champignon** *Psalliota Campestris :*

Cet enzyme a été hautement purifié par Kertesz et Zito [97]. C'est une solution contenant 13,3 mg de matière non dialysable par ml, et conservée au congélateur. Son activité était de 90.900 unités enzymatiques définies selon Hogeboom et Adams [78] par ml en 1958, de 55.000 en 1960. En 1958, 5 µl convenaient pour oxyder totalement 1 ml de substrat *o*-diphénolique 5 mM en présence de tampon phosphates de pH 6,8. Nous avons augmenté les quantités d'enzyme lorsque son activité s'est trouvée diminuée. D'ailleurs la quantité d'enzyme mise en œuvre peut varier sans altérer les phénomènes qui nous intéressent : les mêmes substances apparaissent toujours, mais à une vitesse différente.

Les oxydations sont conduites en ajoutant l'enzyme au substrat en solution 2,5 ou 5 mM, dans l'eau ou en présence de tampon phosphates (pH entre 6,0 et 6,8). Les essais doivent être agités ou présenter une grande surface pour que l'oxygénation soit suffisante.

Sinon l'oxydation est fortement ralentie. La plus grande partie de nos essais sont faits à la température du laboratoire. Quelques-uns ont été réalisés à 37°C (mesures de consommation d'oxygène, oxydation de l'hordénine) ; d'autres au contraire dans un bain de glace à 0°C (recherche des *o*-quinones monocycliques).

H) SPECTROPHOTOMETRIE.

Nous avons utilisé soit le spectrophotomètre Beckman DU, soit l'appareil enregistreur Beckman DK_2. Ce dernier est particulièrement utile pour les essais qui évoluent vite : un enregistrement de 500 à 240 mμ demande moins de 2 minutes. Les cuves sont en silice et ont une longueur optique de 1 cm.

Il faut éviter de laisser les cuves dans l'appareil en dehors des mesures car les substances étudiées sont souvent sensibles aux rayons U.V. D'autre part, les essais laissés dans les cuves ne sont pas suffisamment oxygénés pour qu'une réaction catalysée par la ppo évolue normalement. Il faudra par exemple transvaser les essais dans un petit erlen entre les lectures.

I) MANOMETRIE.

Nous utilisons un appareil de WARBURG, avec des fioles de 15 ml environ, pourvues de un et parfois deux appendices. La cupule centrale contient 0,1 ml de lessive de soude. Nous adoptons la technique classique décrite par UMBREIT et coll. [167].

Le plus souvent la ppo est placée dans l'appendice, sous un volume de 50 ou 100 μl. En réalité il serait préférable de disposer de pipettes très précises pour ajouter l'enzyme sous un très faible volume (1 à 5 μl) ; en effet le mélange de deux solutions de forces ioniques différentes modifie la solubilité de l'oxygène, donc sa pression dans la phase gazeuse ; ceci perturbe légèrement les mesures de consommation d'oxygène.

D'autre part, la solubilité α de l'oxygène est modifiée par la grande concentration en protéines nécessaire pour certaines expériences. Mais le coefficient K des fioles, servant à transformer les variations de hauteur du liquide dans les manomètres en variations du volume gazeux, ne varie que très peu selon la valeur de α. En effet l'une des formules permettant de calculer K pour un volume liquide de 3 ml à la température absolue T est :

$$\frac{K}{T} = Vg \times c - 3\,\frac{1.000\,\frac{273}{T}}{10.000} + 3\,\frac{1.000 \times \alpha}{10.000}$$

Vg étant le volume de la phase gazeuse, c une constante pour une température donnée. Vg × c est de l'ordre de 1,1 pour une fiole de 15 ml, le deuxième terme est de l'ordre de 0,3 et le dernier de l'ordre de 0,009. Donc une diminution de α ne put affecter K que pour 1 % de sa valeur au maximum.

J) REDUCTION DES *O*-QUINONES MONOCYCLIQUES.

Pour mettre en évidence la présence des *o*-quinones monocycliques dérivées directement des *o*-diphénols pendant les premiers

temps de l'oxydation de ces derniers, nous avons cherché à les ramener à l'état d'*o*-diphénol par l'addition d'un réducteur. L'expérience consistait donc à comparer les quantités de diphénol présentes dans le milieu quelques minutes après le début de l'oxydation, et dans le même milieu additionné d'un réducteur au même moment. Pour faciliter les comparaisons, les réducteurs ont été ajoutés sous forme solide : quelques cristaux de bisulfite de sodium ($NaHSO_3$) ou d'iodure de potassium (KI) ou un peu de zinc en poudre. Pour ce dernier, nous avons éliminé l'excès de réactif par filtration après quelques minutes d'action.

Nous avons déjà noté que l'oxydation par la ppo continue au cours du dépôt de la prise chromatographique si l'on ne prend pas la précaution d'inactiver l'enzyme par l'acide sulfurique au moment choisi pour la comparaison. Ceci n'est pas à craindre dans le cas de filtrats obtenus après l'action de PbO_2. Cependant il faut toujours opérer rapidement car la quinone disparaît spontanément (soit par dismutation, soit par action d'un produit réducteur apparu dans le milieu) comme le prouve l'augmentation spontanée de diphénol au cours des minutes suivant la dénaturation de la ppo ou la filtration de PbO_2.

Il convient donc d'opérer ainsi pour l'analyse chromatographique :

a) oxydation par la ppo (dopamine à 2-3°C) : 1,5 min. après l'addition de ppo, ajouter à l'essai son volume de H_2SO_4 2N. Partager en deux portions. Déposer sur papier W_1 lavé 5 µl de l'une (temps 4 minutes) tout en versant un peu de $NaHSO_3$ dans l'autre. Déposer 5µl de la portion réduite. Pour observer la régénération spontanée du diphénol, déposer 5 µl de la portion non réduite au temps 38 min. Chromatographie dans l'eau. Révélation par NO_3Ag am. La quantité de dopamine est la plus grande dans la portion réduite, plus faible dans la portion non réduite temps 38 min., encore plus faible dans la portion non réduite, temps 4 min. ;

b) oxydation par PbO_2. La filtration est arrêtée 2 à 3 min. après l'addition de PbO_2 (qui marque le temps zéro). On prélève un peu de filtrat dans un tube. On dépose sur papier W_1 lavé 5 µl du filtrat (exemple : temps 2 min. 20 sec.). On verse un peu de $NaHSO_3$ ou de KI dans le tube mis à part (2 min. 40 sec.) ; 5 µl de cet essai réduit sont déposés sur papier (4 min.). On peut répéter plusieurs fois l'opération à quelques minutes d'intervalle. On constate que la régénération par l'addition du réducteur est moins sensible à mesure que l'opération est plus tardive, une partie du diphénol étant régénérée spontanément dans le filtrat, et une partie de la quinone étant détruite par un autre mécanisme. [Cf. fig. 9.]

Si l'on cherche à observer la régénération du diphénol au moyen de son absorption dans l'U.V., les réducteurs cités ne conviennent pas : ils provoquent tous une augmentation de la densité optique suffisante pour perturber le dosage spectrophotométrique, de même que quelques autres que nous avons essayés.

Nous avons alors tenté de procéder à une réduction par le courant électrique au niveau d'une cathode. Le dispositif adopté est le suivant : le courant redressé (18 volts) fourni par une valve est appliqué à deux électrodes formées d'une spirale de platine. Celles-ci plongent aux deux extrémités d'une cuvette d'histologie remplie du

milieu à réduire. Quelques lames de verre (pour microscope) limitent suffisamment la diffusion pour maintenir une différence nette de composition entre les deux compartiments extrêmes. Ainsi la résistance n'est pas trop grande et l'intensité suffisante pour que la réduction soit assez rapide. Le milieu d'oxydation par PbO_2 est filtré comme d'habitude, dilué 20 ou 30 fois avec de l'acide sulfurique 1N — pour obtenir une concentration convenant aux lectures de densité optique — et placé dans la cuvette d'histologie. La réduction électrolytique est ainsi mise en train environ 5 min. après le début de l'oxydation. Une partie du milieu dilué est conservée pour suivre au spectrophotomètre son évolution. Aux temps voulus on prélève avec une pipette dans le compartiment convenable le liquide nécessaire pour tracer le spectre avec l'appareil enregistreur.

K) UTILISATION DE LA 2,4-DINITROPHENYLHYDRAZINE.

Ce réactif forme des combinaisons de caractères différents avec les aminochromes d'une part, les *o*-quinones monocycliques d'autre part. Nous n'avons trouvé mention dans la littérature ni de cette propriété, ni de son utilisation.

2 ml de solution de DNPH à 50 mg dans 15 ml d'acide chlorhydrique 2N sont ajoutés à 4 ml du milieu d'oxydation (après filtration pour les oxydations par PbO_2 ou Ag_2O). Le mélange enrichi en HCl pour atteindre une acidité 2N est centrifugé après quelques heures d'attente à 4°C. Le précipité rouge est lavé deux fois par HCl 2N, et mis dans un exsiccateur avec potasse. Les précipités sont ensuite dissous dans l'éthanol absolu. On en trace les spectres à pH acide et alcalin. La chromatographie (BA ; éthanol ; éthanol chlorhydrique) de ces précipités montre qu'ils ne sont pas formés d'un composé pur. Ceci n'est pas pour étonner si l'on considère que les milieux d'oxydation n'ont pas une composition simple, et que la même substance di-, ou même mono-carbonylée peut donner avec la DNPH plusieurs combinaisons. Pour isoler un composé plus pur, nous avons effectué une séparation chromatographique dans l'éthanol chlorhydrique, suivie d'une élution par l'éthanol absolu de la bande intéressante ; nous avons fait les spectres à pH acide et alcalin du composé ainsi purifié, dinitrophénylhydrazone présumée.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

PEROXYDASES

D'après nos expériences, elles conduisent à des composés de type différent selon que le donateur d'hydrogène est un monophénol ou un *o*-diphénol. Dans le premier cas, les deux hydrogènes nécessaires à la réaction avec une molécule d'eau oxygénée sont arrachés aux noyaux aromatiques (donc sur deux molécules) et l'on obtient un polymère. Or, dans certaines circonstances — et en particulier en présence d'oxygène et d'acide dihydroxyfumarique — les peroxydases peuvent conduire à l'*o*-diphénol correspondant par hydroxylation. Ce type de réaction ne s'observe pas dans nos conditions expérimentales. Dans le deuxième cas, ce sont les hydrogènes des fonctions phénoliques qui interviennent (pris à la même molécule d'*o*-diphénol) et l'on arrive à une *o*-quinone.

ACTION DE LA PEROXYDASE VEGETALE SUR LES MONOPHENOLS

a) **Avec la thyronine :**

L'action de la peroxydase et de l'eau oxygénée sur la thyronine a été étudiée en milieu non tamponné (pH environ 5,7) et pour des concentrations en enzyme et en eau oxygénée variables, à la température du laboratoire. A pH 7,4 (tampon phosphates) l'action de l'enzyme s'est révélée tout à fait semblable. La solution stock d'enzyme était à 0,1 %. Des dilutions au 1/10 et au 1/100 de la solution-stock ont été aussi employées.

1° Rapidité de la disparition de la thyronine selon la quantité d'enzyme : » » »

Le milieu est analysé après une minute de réaction (prise : 10 µl) par chromatographie sur papier en BA et révélation par la ninhydrine.

Le tableau I indique les substances retrouvées selon la quantité d'enzyme (en poids dans 1,5 ml du milieu de réaction).

TABLEAU I

Quantité d'enzyme (en µg pour 1,5 ml d'essai)	Composés trouvés après 1 min. de réaction (Thy, 1,7 mM ; H_2O_2 3,9 mN)
50 ou 25	P
5	P T
1 ou 0,5 ou 0,25	P **T** Thy

On voit que la réaction est extrêmement rapide et totale, même pour des quantités d'enzymes faibles. P est un produit blanc, insoluble dans l'eau, ne migrant pas dans le BA. T a un Rf très voisin de celui de la tyrosine en BA. Ce n'est cependant pas de la tyrosine : dans une chromatographie de longue durée, où de la tyrosine a été déposée en surcharge au même point qu'un milieu contenant T, les deux substances se séparent.

2° Propriétés de T et de P :

Nous avons étudié les propriétés de T et de P afin de préciser leur nature. P étant insoluble dans l'eau, il nous a été possible, après centrifugation du milieu de réaction et lavage à l'eau du précipité, d'en préparer plusieurs dizaines de mg. Nous avons pu alors obtenir des renseignements plus complets sur sa structure. Il est intéressant comme produit final de la réaction. Il semble bien même que ce soit le seul : en effet, par chromatographie on ne constate la présence d'aucun autre corps pour des temps de réaction longs et des quantités d'enzymes suffisantes. De plus, au cours de la préparation, on atteint des rendements de 80 % (en poids de P par rapport au poids de thyronine engagé) bien que la précipitation en l'absence de sels soit souvent incomplète (voir ci-dessous).

a) *Réactions colorées.*

Après migration dans le BA, les composés T et P donnent les réactions colorées résumées dans le tableau II.

TABLEAU II

	Ninhydrine	R. de Pauly	NO_3Ag am.
T	+	jaune-orangé	lentement ; brun ou noir
P	+	orangé	lentement : brun
Thy	+	rose	lentement : brun
Tyr	+	orangé	rien
P' (à partir de Tyr) ..	+	jaune	lentement : brun

Exemple

— *Composition de l'essai :* 1 ml Thy 2,5 mM + 5 µl d'enzyme à 0,001 % (0,05 µg) + 0,5 ml H_2O_2 à 0,02 %.

— *Chromatogramme* W_1 BA : 10 µl aux temps 6 min., 28 min., 2 h. 50 min. révélés à la ninhydrine ; 300 µl (de 1 min. à 28 min.) révélés par NO_3Ag am. ; 100 µl (au temps 3 h.) révélés au réactif de Pauly. Témoins : 3'-hydroxythyronine par NO_3Ag am. ; thyronine, tyrosine, 3'-hydroxythyronine au réactif de Pauly.

— *Résultats*

Révélation à la ninhydrine : la thyronine diminue en fonction du temps.. Taches de T très faibles. P : non apparent jusqu'à 28 min., faible pour 2 h. 50 min.

Révélation par NO_3Ag am : sont révélés : la thyronine, T, P et une faible tache au-dessus de P. Pas d'hydroxythyronine. Révélation au réactif de Pauly : P (orangé un peu rose), T (jaune-orangé), thyronine.

b) *Migration dans quelques solvants.*

Dans l'eau, P ne migre pas ; T a un Rf voisin de celui de la tyrosine (0,5 environ).

Dans l'AA, P ne migre pas, T non plus.

Dans l'ammoniaque 2N, P donne une tache bien définie, de Rf élevé, avec une faible traînée.

c) *Facteurs intervenant dans la précipitation de P.*

En général les essais se troublent très rapidement par l'apparition d'un précipité de P. Cependant, on ne voit parfois apparaître qu'un louche, parfois l'essai reste limpide même après plusieurs heures.

En choisissant comme conditions : Thy 1,7 mM ; H_2O_2 3,9 mN ; enzyme 1 µg/1,5 ml de l'essai, nous avons fait une étude systématique de ce phénomène en faisant varier d'une part la solution d'enzyme utilisée — plus ou moins ancienne et plus ou moins diluée — d'autre part l'ordre dans lequel étaient ajoutés l'enzyme et l'eau oxygénée à la thyronine.

Nous avons obtenu des temps et des taux de précipitation très variables, alors que la quantité de Thy consommée au bout d'un temps donné était toujours la même.

Mais il est impossible de rattacher ces différences soit à la nature de la préparation enzymatique utilisée, soit à l'ordre dans lequel sont ajoutés les réactifs. D'autre part l'addition de sels provoque la précipitation des essais demeurés limpides ou peu troubles. On obtient alors un précipité bien rassemblé. Ceci laisse penser que P est une molécule assez grosse, floculant ou non selon la force ionique du milieu et selon des facteurs non connus, variant d'une expérience à une autre apparemment semblable.

Enfin la précipitation de P s'effectue dans une zone de pH définie (pH voisins de 5 et 6), alors qu'il est soluble aux pH plus acides ou plus alcalins. Ceci est en accord avec la constatation qu'il doit posséder, comme la Thy, des fonctions -COOH et -NH2 puisqu'il réagit avec la ninhydrine. C'est donc un corps amphotère.

d) *Spectre de P.*

La figure 3 représente en A le spectre obtenu avec une solution de P dans l'acide acétique au trentième, à raison de 1 mg par ml. En B, spectre de la même solution alcalinisée avec quelques gouttes de soude.

Pour une même concentration (en g/l) une solution de P et une solution de Thy ont des densités optiques très voisines ; alors que la densité optique d'une solution d'*o*-diphénol est en général deux à quatre fois plus élevée que celle du monophénol correspondant.

e) *Analyse élémentaire de P.*

Les pourcentages des quatre éléments sont donnés dans le tableau III.

TABLEAU III

Analyse élémentaire de P (*)

	O (p. cent)	H (p. cent)	C (p. cent)	N (p. cent)
P	26,26 25,87	5,35 5,65	63,27 64,10	4,82
Thy (calc.) ...	23,44	5,49	65,93	5,13
Tyr (calc.)	26,7	6,08	59,7	7,73

(*) Nous remercions le laboratoire de micro-analyse des établissements CIBA (Docteur H. Gysel) qui a effectué pour nous cette analyse.

Il nous a été précisé que le corps analysé étant hygroscopique, les résultats risquaient d'être légèrement faussés dans le sens suivant :

— appréciation par défaut du carbone et de l'azote,

— appréciation par excès de l'oxygène (et de l'hydrogène).

Une certaine quantité d'eau ne faussant pas le rapport du nombre d'atomes d'azote au nombre d'atomes de carbone, ce rapport peut être calculé directement : il est de $1/15$ $\left(\frac{63,7}{12} \quad \frac{14}{4,82} = 15,4\right)$ comme dans la thyronine. On a donc un polymère de la Thy ou de l'un de ses dérivés sans rupture du pont phényléther.

Si l'unité du polymère est la thyronine moins deux hydrogènes, sa masse sera 271 ; si cette unité dérive au contraire de l'hydroxythyronine, sa masse sera 287. Supposons qu'il existe par unité de polymère x molécules d'eau (x étant éventuellement un nombre fractionnaire). La masse-unité du polymère deviendra respectivement $271 + 18\,x$ ou $287 + 18\,x$. Calculons dans chacun de ces deux cas le pourcentage des quatre éléments :

	1er cas	2e cas
oxygène :	$\frac{64 + 16\,x}{271 + 18\,x}$	$\frac{80 + 16\,x}{287 + 18\,x}$
carbone :	$\frac{180}{271 + 18\,x}$	$\frac{180}{287 + 18\,x}$
azote :	$\frac{14}{271 + 18\,x}$	$\frac{14}{287 + 18\,x}$
hydrogène :	$\frac{13 + 2\,x}{271 + 18\,x}$	$\frac{13 + 2\,x}{287 + 18\,x}$

En égalant ces pourcentages en fonction de x à la moyenne des pourcentages trouvés expérimentalement, nous aurons des équations qui, une fois résolues, nous donneront chacune une valeur pour x. Si l'une de nos deux hypothèses sur la nature de l'unité du polymère est exacte, les quatre valeurs correspondantes seront identiques, aux erreurs d'expérience près.

Si les quatre valeurs de x sont trop dissemblables, c'est que l'hypothèse était erronée.

Dans le premier cas :

Oxygène

$$\frac{26}{100} = \frac{64 + 16\,x}{271 + 18\,x} \qquad \text{soit } \left(\frac{26}{100}\,271 - 64\right) + \left(\frac{26}{100}\,18 - 16\right)x = 0$$

$$\text{ou } (70,5 - 64) + (4,68 - 16)\,x = 0 \qquad \text{d'où } x = \frac{6,5}{11,32} = 0,575$$

Carbone

$$\frac{63,7}{100} = \frac{180}{271 + 18\,x} \qquad \text{soit } \left(\frac{63,7}{100}\,271 - 180\right) + \frac{63,7}{100}\,18\,x = 0$$

$$\text{ou } (172,5 - 180) + 11,47\,x = 0 \qquad \text{d'où } x = \frac{7,5}{11,47} = 0,655$$

AZOTE

$$\frac{4{,}82}{100} = \frac{14}{271 + 18\,x} \qquad \text{soit } \left(\frac{4{,}82}{100}\,271 - 14\right) + \frac{4{,}82}{100}\,18\,x = 0$$

ou $(13{,}6 - 14) + 0{,}868\,x = 0$ d'où $x = \dfrac{0{,}94}{0{,}868} = 1{,}08$

HYDROGÈNE

$$\frac{5{,}5}{100} = \frac{13 + 2\,x}{271 + 18\,x} \qquad \text{soit } \left(\frac{5{,}5}{100}\,271 - 13\right) + \left(\frac{5{,}5}{100}\,18 - 2\right)x = 0$$

ou $(14{,}9 - 13) + (0{,}99 - 2)\,x = 0$ d'où $x = \dfrac{1{,}9}{1{,}01} = 1{,}88$

Dans le deuxième cas :

OXYGÈNE

$$\frac{26}{100} = \frac{80 + 16\,x}{287 + 18\,x} \qquad \text{soit } \left(\frac{26}{100}\,287 - 80\right) + \left(\frac{26}{100}\,18 - 16\right)x = 0$$

ou $(74{,}6 - 80) + (4{,}68 - 16)\,x = 0$ d'où $x = -\dfrac{5{,}4}{11{,}32}$

CARBONE

$$\frac{63{,}7}{100} = \frac{180}{287 + 18\,x} \qquad \text{soit } \left(\frac{63{,}7}{100}\,287 - 180\right) + \frac{63{,}7}{100}\,18\,x = 0$$

ou $(182{,}8 - 180) + 11{,}47\,x = 0$ d'où $x = -\dfrac{2{,}8}{11{,}47}$

AZOTE

$$\frac{4{,}82}{100} = \frac{14}{287 + 18\,x} \qquad \text{soit } \left(\frac{4{,}82}{100}\,287 - 14\right) + \frac{4{,}82}{100}\,18\,x = 0$$

ou $(13{,}83 - 14) + 0{,}868\,x = 0$ d'où $x = \dfrac{0{,}17}{0{,}868} = 0{,}196$

HYDROGÈNE

$$\frac{5{,}5}{100} = \frac{13 + 2\,x}{287 + 18\,x} \qquad \text{soit } \left(\frac{5{,}5}{100}\,287 - 13\right) + \left(\frac{5{,}5}{100}\,18 - 2\right)x = 0$$

ou $(15{,}8 - 13) + (0{,}99 - 2)\,x = 0$ d'où $x = \dfrac{2{,}8}{1{,}01} = 2{,}78$

Cette deuxième hypothèse donne pour x deux valeurs très différentes et deux valeurs négatives qui sont évidemment inacceptables. Elle est donc à abandonner.

La première hypothèse donne pour x des valeurs qui sont du même ordre de grandeur. Reste à vérifier que les erreurs commises dans le dosage des éléments peuvent rendre compte des écarts observés entre ces valeurs de x. En l'absence de renseignements émanant du laboratoire d'analyses, nous admettrons que l'erreur relative probable est au moins de l'ordre de trois centièmes. L'écart des deux chiffres donnés pour l'hydrogène montre que l'erreur est plus grande pour cet élément (trois cinquantièmes), ce qui expliquerait que la valeur de x correspondante s'écarte plus notablement des autres.

Calcul d'erreurs : x est donné par le quotient de deux termes A et B, chacun formé d'une différence :

$$x = \frac{A}{B} = \frac{a - a'}{b - b'}$$

Nous avons donc $\frac{\Delta x}{x} = \frac{\Delta A}{A} + \frac{\Delta B}{B}$ et

$$\Delta A = \Delta a + \Delta a', \quad \Delta B = \Delta b + \Delta b'$$

Or, a' et b' étant des nombres exacts (erreurs négligeables), $\Delta a'$ et $\Delta b'$ sont nuls.

a et b sont de la forme $\frac{\alpha}{100}\alpha'$ et $\frac{\beta}{100}\beta'$ où 100, α' et β' sont des nombres exacts

$$\text{Donc } \frac{\Delta a}{a} = \frac{\Delta \alpha}{\alpha} \qquad \text{et } \frac{\Delta b}{b} = \frac{\Delta \beta}{\beta}$$

d'où $\Delta A = \Delta a = \frac{\Delta \alpha}{\alpha} a$ et $\Delta B = \Delta b = \frac{\Delta \beta}{\beta} b$

α et β sont les pourcentages trouvés expérimentalement. Nous avons admis pour ce calcul une erreur relative de 0,03.

Donc $\frac{\Delta \alpha}{\alpha}$ et $\frac{\Delta \beta}{\beta}$ sont égaux à 0,03.

Nous pouvons écrire (en arrondissant pour simplifier les calculs) :

— pour l'oxygène :

$$\Delta A = 0{,}03 \times 70{,}5 = 2{,}12 \qquad \frac{\Delta A}{A} = \frac{2{,}12}{6{,}5} = 0{,}326$$

$$\Delta B = 0{,}03 \times 4{,}7 = 0{,}141 \qquad \frac{\Delta B}{B} = \frac{0{,}141}{11} = 0{,}013$$

$$\frac{\Delta x}{x} = 0{,}326 + 0{,}013 = 0{,}339 \quad \text{d'où} \quad 0{,}380 < x < 0{,}770$$

— pour le carbone :

$$\Delta A = 0{,}03 \times 172{,}5 \qquad \frac{\Delta A}{A} = \frac{0{,}03 \times 172{,}5}{7{,}5} = 0{,}69$$

$$\frac{\Delta B}{B} = \frac{\Delta b}{b} = 0{,}03 \ (b' = 0)$$

$$\frac{\Delta x}{x} = 0{,}69 + 0{,}03 = 0{,}72 \quad \text{d'où} \quad 0{,}183 < x < 1{,}127$$

— pour l'azote :

$$\Delta A = 0{,}03 \times 13 = 0{,}39 \qquad \frac{\Delta A}{A} = \frac{0{,}39}{0{,}94} = 0{,}414$$

$$\frac{\Delta B}{B} = \frac{\Delta b}{b} = 0{,}03 \ (b' = 0)$$

$$\frac{\Delta x}{x} = 0{,}414 + 0{,}03 = 0{,}444 \quad \text{d'où} \quad 0{,}60 < x < 1{,}56$$

— pour l'hydrogène :

$$\Delta A = 0{,}06 \times 15 = 0{,}9 \qquad \frac{\Delta A}{A} = \frac{0{,}9}{1{,}9} = 0{,}474$$

$$\Delta B = 0{,}06 \times 0{,}99 \qquad \frac{\Delta B}{B} = \frac{0{,}06 \times 0{,}99}{1{,}01} = 0{,}06$$

$$\frac{\Delta x}{x} = 0{,}474 + 0{,}06 = 0{,}534 \text{ d'où } 0{,}88 < x < 2{,}88$$

Une valeur de x proche de 0,8 se trouve donc pratiquement compatible avec les données expérimentales des quatre dosages, si les erreurs sont de l'ordre de 3 % (et de 6 % pour l'hydrogène).

Nous pouvons donc accepter la première hypothèse : l'unité du polymère dérive de la thyronine par enlèvement de deux hydrogènes (ou un).

On peut donc admettre qu'il n'y a pas eu, au cours de la formation de P, une oxygénation de la Thy mais plutôt une oxydation par déshydrogénation. Ceci est en accord avec notre échec dans la caractérisation de l'hydroxythyronine pendant la réaction (voir paragraphe suivant). Nous pouvons donc dire que l'enzyme a bien agi en tant que peroxydase, catalysant la réduction de l'eau oxygénée par un donateur d'hydrogène, et non en tant qu'oxydase.

3° Recherche de l'hydroxythyronine :

Les tentatives de mise en évidence de l'hydroxythyronine ont échoué (utilisation de très faibles quantités d'enzyme : 0,01 ou 0,05 µg dans 1,5 ml d'essai ; extraction par du butanol acétique après des temps de réaction très courts). Mais il faut noter que l'hydroxythyronine est elle-même dégradée par la peroxydase et l'eau oxygénée. Il ne serait donc pas exclu *a priori* que l'hydroxythyronine soit consommée totalement par l'enzyme au fur et à mesure de sa formation.

Cependant cette hypothèse ne doit pas être retenue car nous verrons plus loin que l'enzyme ne paraît pas avec l'hydroxythyronine conduire aux mêmes produits qu'avec la Thy.

b) **Avec la tyrosine :**

Dans les conditions expérimentales décrites pour la thyronine la tyrosine est aussi consommée, mais moins rapidement que la thyronine.

Exemple.

— *Composition de l'essai :* 1 ml de Tyr 2,5 mM dans l'eau + 0,25 ml d'enzyme à 0,1 % (250 µg) + 0,5 ml d'H_2O_2 à 0,02 %.

— *Chromatogramme* W_1 BA ; révélation à la ninhydrine :

— 7 µl de l'essai aux temps 1 h. et 18 h. 30 min.

— gamme de tyrosine correspondant à 100, 75, 50 et 25 % de la quantité initiale.

— *Résultats.*

Il reste environ 50 % de la Tyr après 1 h., 25 % après 18 h. 30 min. Il apparaît une tache ne migrant pas en BA, augmentant avec le temps, et une ou deux taches de très faible Rf peu marquées, ne se séparant bien du départ que dans de longues migrations.

Le composé ne migrant pas en BA est appelé P' (par analogie avec P provenant de la Thyr). Il a un Rf nul dans l'AA ; il est soluble dans l'eau et donne par chromatographie dans ce solvant

une tache bien définie située près du front. Ses réactions colorées ont été notées dans le tableau II : elles indiquent qu'il contient des fonctions acides α-aminés et des fonctions phénoliques (mais non *o*-diphénoliques).

Soulignons que nous n'avons pas trouvé de tache pouvant être identifiée à la dityrosine de SIZER et GROSS [64, 158]. Nous avons cherché sans succès cette dernière en opérant dans les conditions qui semblent avoir été les leurs (à 37°C et en présence de tampon phosphate 0,1 M de pH 7,4), et en effectuant une chromatographie bidimensionnelle du milieu de réaction : BA puis eau ou BA puis AA. Ces essais semblent évoluer comme ceux qui sont effectués dans nos conditions expérimentales. P' est probablement un polymère de Tyr comportant plus de deux unités.

Au cours de la réaction entre la peroxydase, l'eau oxygénée et la Tyr, le milieu passe par diverses colorations : jaune, puis jaune rosé, et enfin jaune stable ; cette gamme est parcourue plus ou moins vite selon la quantité d'enzyme utilisée. On n'arrive jamais à une coloration noire.

Le fait que l'on ne trouve pas de dopa dans le milieu de réaction avec la Tyr confirme que l'enzyme agit par déshydrogénation donc en tant que peroxydase. Au contraire, un essai utilisant le même enzyme dans les conditions de MASON et coll. [128] (en présence d'acide dihydroxymaléique et d'oxygène moléculaire) montre bien la formation de dopa (réactions avec la ninhydrine, NO_3Ag am. et le réactif de PAULY) par hydroxylation de la tyrosine, l'enzyme agissant en tant qu'oxydase.

c) **Avec la MIT et la DIT :**

A 1 ml de solution stock de MIT ou de DIT (2,5 mM dans l'eau) nous ajoutons en général 0,5 ml d'eau oxygénée à 0,02 % et des quantités d'enzyme variant entre 250 µg et 2,5 µg. Les essais sont conduits à la température du laboratoire, et analysés par chromatographie sur papier, d'ordinaire en BA.

Nous constatons que la **DIT** est consommée beaucoup plus rapidement que la MIT. Le milieu d'oxydation de la DIT jaunit. Il apparaît un précipité jaune foncé, en moins de 30 sec. pour 250 µg d'enzyme ; pour cette quantité d'enzyme il ne reste dans le milieu que des iodures et un composé ne migrant pas dans le BA (correspondant au précipité observé) et appelé D. D réagit avec le réactif cérique, la ninhydrine, le nitrate d'argent et le réactif de PAULY. Il est donc iodé, contient des fonctions α-aminoacides et phénols. Pour des quantités d'enzyme plus faibles, on observe des intermédiaires iodés, de faibles Rf en BA, compris entre le départ et les iodures, dépassant parfois légèrement ces derniers [Cf. fig. 4]. On ne trouve ni MIT ni 5-hydroxy-3-iodotyrosine.

EXEMPLE.

— *Composition de l'essai :* 1 ml de DIT 2,5 mM + 0,5 ml H_2O_2 à 0,02 % + 0,5 ml d'enzyme à 0,001 % (5 µg). L'essai jaunit en quelques minutes.

— *Composition du témoin :* identique sauf l'enzyme remplacé par de l'eau.

— *Chromatogrammes :*

a) W_1 BA. Révélation au réactif cérique : 5 µl de l'essai aux temps 2, 15, 30, 60 et 110 min. ; 5 µl du témoin aux temps 15 et 90 min. ;

b) W_4 BA. Essai au temps 20 h. : 5 µl pour le réactif cérique ; 200 µl pour NO_3Ag am ; 200 µl pour la ninhydrine ;

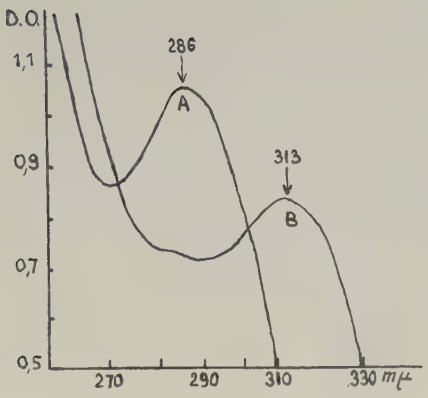


FIG. 3. — Enregistrement du spectre de P. Détails expérimentaux dans le texte.

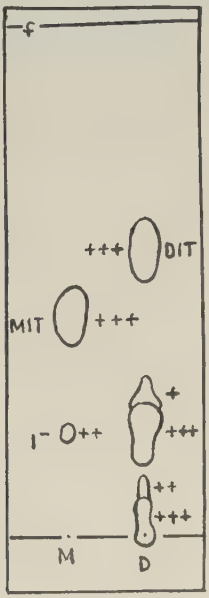


FIG. 4. — Chromatogramme en BA de deux essais concomitants d'oxydation de MIT (M) et de DIT (D) : 1 ml de MIT ou de DIT 2,5 mM + 0,5 ml H_2O_2 à 0,02 % + 0,5 ml de peroxydase à 0,001 % (5 μg) ; 60 min. d'oxydation. Prise d'essai : 511. Révélation cérique. +, ++, +++ symbolisent des intensités croissantes.

c) W_1 BA. Au temps 48 h. 5 µl de l'essai et 5 µl du témoin. Révélation cérique.

— *Résultats.*

Diminution de la DIT sensible dès 30 min. Il en reste encore après 20 h., mais plus après 48 h.

Apparition d'iodures, très nets dès 15 min., augmentant ensuite. Faible tache iodée au-dessous des iodures, absente après 20 h. D au départ, dès 15 min. augmentant avec le temps.

Taches entre D et les iodures, augmentant aussi avec le temps.

Disparition dans les premiers temps de la trace de MIT présente comme impureté de la DIT.

Le témoin ne contient que la DIT, la trace de MIT, et après 48 h. une trace d'iodures.

Les différents composés révélés par le réactif cérique réagissent aussi avec NO_3Ag am. et la ninhydrine.

La **MIT** est consommée à une vitesse plus faible. Elle est en partie désiodée. Ensuite les iodures ainsi libérées iodent en présence d'eau oxygénée et de peroxydase la MIT restante et il apparaît de la DIT, en même temps qu'une substance ressemblant à D (ne migrant pas dans le BA, révélée par le réactif cérique, la ninhydrine, NO_3Ag am., le réactif de PAULY et l'α-nitroso-β-naphtol) si bien que l'on ne peut savoir si cette dernière provient de la DIT ou directement de la MIT. On voit aussi au même moment des substances de faibles Rf, comme à partir de la DIT.

EXEMPLE.

— *Composition de l'essai :* 1 ml de MIT 2,5 mM dans l'eau + 0,5 ml H_2O_2 à 0,02 % + 0,5 ml d'enzyme à 0,001 % (5 µg). L'essai reste incolore même après 90 min.

— *Composition du témoin :* identique sauf l'enzyme remplacé par de l'eau.

— *Chromatogrammes :*

a) W_1 BA. Révélation cérique : 5 µl de l'essai aux temps 2, 5, 20, 60 et 90 min. ; 5 µl du témoin 90 min. ;

b) W_4 BA au temps 20 h. : 5 µl de l'essai et 5 µl du témoin pour le réactif cérique ; 200 µl de l'essai pour NO_3Ag am. ; 200 µl de l'essai pour la ninhydrine.

— *Résultats.*

La disparition de la MIT n'est pas encore sensible pour 90 min. Les iodures apparaissent lentement ; ils ne sont pas encore apparents pour 20 min. (cf. fig. 4).

La DIT, les taches situées entre le départ et les iodures, et au départ, sont visibles après 20 h.

Le témoin ne contient que la MIT au temps 90 min., la MIT et une trace d'iodures au temps 20 h.

Les composés révélés par le réactif cérique réagissent aussi avec NO_3Ag am. et avec la ninhydrine.

100 µl d'un essai similaire après 24 h. de réaction, révélés à l'α-nitroso-β-naphtol faisaient apparaître la tache de départ et la MIT en jaune (fonction phénol ayant en *ortho* une position libre et une position occupée).

Nous avons parfois rencontré (pour des prises d'essai de 10 à 50 µl) des substances iodées de Rf 0,9 en BA, donc migrant plus loin que les thyronines iodées, formées dans les milieux de réaction avec la DIT. Mais nous n'avons jamais rencontré de thyronines iodées, qui auraient pu être formées par condensation de deux molécules de DIT, ou d'une molécule de DIT et d'une de MIT.

d) **Avec les thyronines iodées :**

1) La 3-T_1 et la 3'-T_1 ont été oxydées dans des conditions à peu près identiques à celles que nous avons utilisées pour la Thy, avec ou sans tampon. La 3,5,3'-T_3 étant moins soluble nous avons utilisé des solutions 0,25 mM. La quantité d'enzyme nécessaire pour ce composé est plus grande que pour les deux premiers ou pour la Thy. La 3,5,3'-T_3 a été oxydée soit dans l'eau soit à pH 6,8 ou 7,4 (tampon phosphates), soit à pH 8-8,5 (ammoniaque diluée ou tampon carbonate d'ammonium).

● Pour ces trois thyronines iodées, nous avons observé l'apparition d'iodures libres, donc une désiodation. La chromatographie révèle des composés semblables à ceux que nous avons rencontrés en partant de la DIT : placés au départ et entre le départ et les iodures en BA, ne migrant ni en AA ni en eau. La tache de départ peut être révélée par la ninhydrine, NO_3Ag am. ou le réactif de PAULY.

● Dans plusieurs expériences sur la T_3 la formation d'une quantité assez importante de DIT témoigne de la rupture du pont phényléther pour une partie au moins des molécules. A partir de 3-T_1 et de 3'-T_1, il nous est arrivé de déceler de très faibles quantités de MIT. Or le système peroxydase-eau oxygénée-iodures est capable — et nous l'avons vérifié — d'ioder la tyrosine en donnant de la MIT, et la MIT en donnant de la DIT (une légère iodation se produit même en l'absence d'enzyme). C'est ainsi que les tyrosines iodées pourraient se former à partir de 3'-T_1 après rupture du pont phényléther. D'autre part, cette rupture du pont phényléther peut s'être produite pour une faible proportion des molécules pendant la conservation des thyronines iodées depuis leur préparation. Dans le cas de la 3'-T_1, on aurait ainsi des traces de Tyr, insuffisantes peut-être pour se révéler à la ninhydrine, mais pouvant s'ioder pendant les expériences en donnant de la MIT, révélée par le réactif cérique plus sensible.

Nous avons alors cherché à mettre en évidence les tyrosines iodées dans des expériences portant sur des thyronines iodées purifiées : débarrassées juste avant leur utilisation de Tyr, MIT ou DIT par chromatographie en BA et élution par du méthanol contenant 1 % d'ammoniaque concentrée. Nous avons ainsi mis en œuvre la 3-T_1, la 3,5,3'-T_3 et un mélange de 3-T_1 et 3,5-T_2 (très difficiles à séparer), en faisant varier le pH et les concentrations en enzyme et en eau oxygénée. Chaque purification portait sur de très petites quantités de thyronine iodée ; après évaporation du méthanol ammoniacal, nous reprenions le contenu de la capsule par un volume connu d'eau ou de tampon, sans déterminer le poids de thyronine iodée recueillie (moins de 1 mg). Un témoin sans enzyme, mais contenant l'eau oxygénée, était analysé par chromatographie — BA puis eau — exactement aux mêmes temps que l'essai.

De la DIT a été trouvée en quantité importante à partir de T_3 (80 µl H_2O_2 à 0,2 % et 100 µg d'enzyme pour 1 ml ; temps 70 - 90 min. ; prise d'essai 200 µl) à pH 8,5, alors que ni le témoin, ni les essai et témoin à pH 6,8 n'en contenaient.

Des traces de MIT et de DIT ont été trouvées à partir du mélange 3-T_1 et 3,5-T_2 (50 µl H_2O_2 à 0,2 % et 25 µg d'enzyme pour 1 ml ; pH 7,4 ; temps 4-20 min. ; prise 150 µl) ; le témoin n'en contenait pas.

Nous n'avons pas trouvé de tyrosines iodées dans nos autres essais et témoins, en particulier pour :

— le mélange de 3-T_1 et 3,5-T_2 ; même composition que le précédent mais en milieu non tamponné.

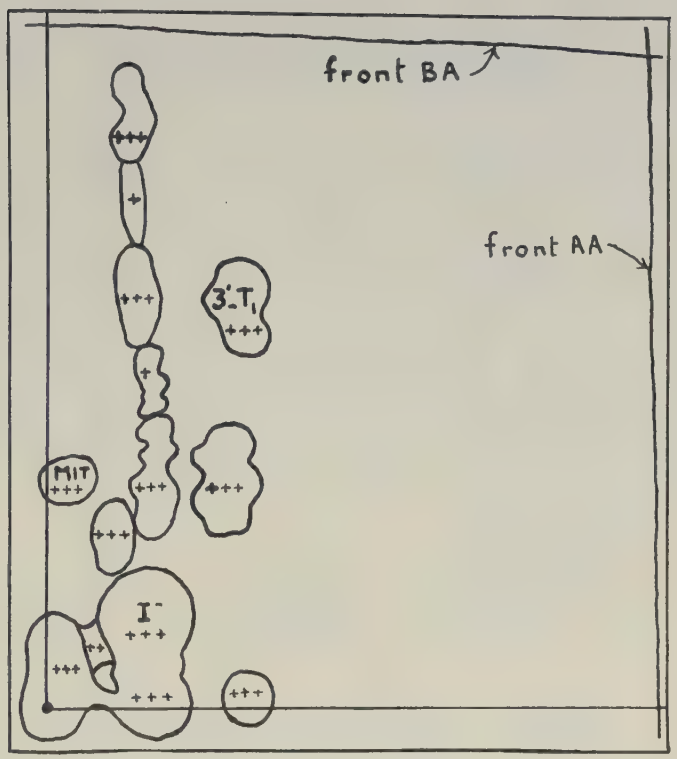


FIG. 5. — Chromatogramme bidimensionnel (BA puis AA) d'un essai d'oxydation de 3'—T_1 (1 ml de 3'—T_1 à 1 mg/ml d'eau + 0,5 ml H_2O_2 à 0,01 % + 1 µl d'enzyme à 0,1 %, soit 1 µg). Prise d'essai : 100 µl, au temps 32 min.

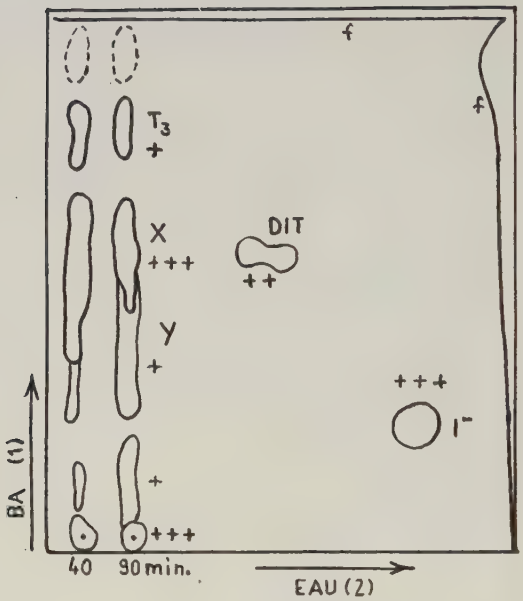


FIG. 6. — Chromatogramme bidimensionnel en BA et eau d'un essai d'oxydation de 3,5,3'—T_3. Conditions expérimentales de l'exemple donné dans le texte.

Le fait que la plupart des composés ne migrent pas dans la deuxième dimension permet de déposer plusieurs points sur une même feuille de papier. Révélation cérique. +, ++ +++ symbolisent des intensités croissantes.

— 3-T_1 (25 µl H_2O_2 à 0,2 % et 1 µg d'enzyme pour 1 ml ; sans tampon ; 5 min. et 15 min. ; prise 50 µl).

— T_3 (25 µl H_2O_2 à 0,2 % et 100 µg d'enzyme pour 1 ml ; pH 7,4 ; temps 10 min. ; 25 min., 60 min. ; prise 100 µl).

La rupture du pont phényléther n'est donc prouvée nettement que pour la T_3 à pH 8,5. Mais il est possible qu'elle ait lieu dans les autres cas, et que les tyrosines iodées, attaquées elles aussi par la peroxydase et l'eau oxygénée, ne s'accumulent pas.

● A partir de 3-T_1 (25 µl H_2O_2 à 0,2 % et 1 µg d'enzyme pour 1 ml ; sans tampon ; temps 5 min. et 15 min.) un intermédiaire iodé est visible ; son Rf est égal ou légèrement supérieur à celui de la MIT en BA, et nul en eau. Un intermédiaire iodé de comportement chromatographique identique est rencontré à partir de 3'-T_1 dans les mêmes conditions expérimentales. Ces composés nouveaux sont de nature inconnue. Ils sont peut-être à rapprocher de X, formé à partir de T_3 (voir ci-après). La figure 5 montre la complexité du milieu d'oxydation de la 3'-T_1.

● Dans le cas de T_3 [fig. 6] on trouve un corps iodé X migrant au niveau de la DIT en BA. Parfois une tache iodée plus faible Y s'individualise entre X et les iodures. En eau ces deux composés ne migrent pas du tout, la T_3 migre très peu et la DIT a un Rf de 0,5 environ. Une chromatographie bidimensionnelle — BA et eau — permet donc de séparer ces composés et d'étudier leurs réactions colorées. X se forme aux trois pH étudiés (5,7 dans l'eau, 6,8 et 8-8,5).

Exemple

— 10 ml de T_3 (1,5 mg/10 ml) dans l'eau + 1 ml de tampon carbonate d'ammonium 0,1 M (pH 8,25) + 5 ml H_2O_2 à 0,02 % + 0,2 ml d'enzyme à 0,1 % (200 µg).

Après 75 min. de réaction, on agite avec 10 ml de BA et on centrifuge 10 min. à 5.000 tours/min. pour séparer les deux phases.

— *Chromatogramme :* W_1 Eau puis BA (même disposition que dans la fig. 6. La partie droite est révélée par le réactif cérique) : 2 fois 1.600 µl de phase butanolique : pour la ninhydrine et pour NO_3Ag am.

— *Résultats :* NO_3Ag am. ne fait rien apparaître, sauf un peu de gris au départ (mais le composé iodé ne migrant pas ne doit passer dans la phase butanolique qu'en très faible proportion). La ninhydrine révèle la T_3 résiduelle, X, Y et la tache de départ.

Dans une expérience identique, où 1.500 µl de phase butanolique sont révélés après migration par le réactif de Pauly la T_3 résiduelle apparaît en rose après l'alcalinisation, X apparaît en jaune avant, et jaune-orangé après l'alcalinisation. La tache de départ et une faible traînée la reliant à X ont la même couleur que X.

Si l'on part de T_3 marquée en 3', X est radioactif. Il doit donc être encore iodé en 3'. D'après ses réactions colorées il possède des fonctions α-aminoacide et phénol (mais non *ortho*-diphénol). Ce pourrait être un dimère de la T_3 ayant conservé l'un au moins des deux atomes d'iode en 3'.

Dans une chromatographie bidimensionnelle, BA puis AA, X se sépare dans la deuxième dimension de la DIT (Rf nul en AA) mais se place au niveau des iodures ; on peut se demander si ce que révèle le réactif cérique n'est pas une tache d'iodures issus de la décomposition de X. Cependant le dépôt d'ammoniaque concentrée sur la

prise d'essai avant les migrations en BA puis eau ne modifie pas la quantité de X trouvée, ce qui est en faveur de la stabilité de ce corps. De plus, il est peu vraisemblable que la libération d'iodures par décomposition de X conduise uniquement à des molécules non iodées ; or on ne trouve pas d'autres taches à ce niveau par la révélation cérique. X a donc probablement le même Rf que les iodures en AA.

Au cours d'une électrophorèse de 3 h. 30 min. dans un tampon carbonate d'ammonium 0,1 M de pH 9 (480 volts pour 25 cm de longueur ; 0,75 mA/cm de largeur), après migration en BA dans la première dimension, X est resté sur la ligne de départ alors que la T_3 se déplaçait de 3 cm et la DIT de 10 cm vers l'anode.

X s'est montré insoluble dans tous les solvants que nous avons essayés sauf le butanol ou l'éthanol contenant au moins 5 % d'acide acétique. Ce dernier présentant une forte absorption au-dessous de 245-250 mμ, il ne nous a pas été possible d'obtenir un spectre de X.

2) La T_4 est difficilement attaquée par la peroxydase, même avec des quantités d'enzyme plus grandes que pour la T_3.

Exemple

— 1 ml de T_4 0,25 mM + 0,1 ml de tampon carbonate d'ammonium 0,1 M (pH 8,5) + 0,50 ml d'enzyme à 0,1 % (500 μg) + 0,5 ml de H_2O_2 à 0,02 %.

— *Chromatogramme :* W_1 BA. Révélation cérique : 100 μl aux temps 10 min., 65 min., 5 h.

— *Résultats :* A côté de la T_4 on ne trouve que des iodures, non encore visibles pour 10 min., puis augmentant avec le temps. Pas de tache au départ.

Dans une expérience identique, 750 μl au temps 48 h. ont été portés en chromatographie bidimensionnelle, AA puis eau. A côté de la T_4 résiduelle et des iodures, le réactif cérique a révélé un peu de DIT, une tache de même migration que la 3,3',5'-T_3 et une très faible tache de même migration que la 3,5,3'-T_3. Pour un temps de réaction aussi long il est difficile d'affirmer qu'il s'agit uniquement de l'activité peroxydasique de l'enzyme.

ACTION DE LA PEROXYDASE VEGETALE SUR LES *ORTHO*-DIPHENOLS

a) Avec la dopa :

Plusieurs expériences ont été réalisées soit dans l'eau, soit à pH 6,8, avec des quantités d'enzymes et d'eau oxygénée variables. Nous avons toujours observé une coloration passant du jaune au rose instantanément, puis du rose (ou rouge) au noir plus lentement. Au bout de plusieurs heures, on obtient des grains noirs surmontés d'un liquide plus ou moins gris (les témoins sans enzyme subissent la même évolution, mais plus lentement).

L'analogie avec la mélanisation catalysée par la ppo a été établie (*) :

— par les spectres en visible du milieu de réaction : maximum sur 475 mμ.

(*) Une analogie supplémentaire avec les oxydations catalysées par la ppo est la formation — en quantité faible, il est vrai — du même thioéther en présence de glutathion (cf. p. 61).

— par la mise en évidence après chromatographie sur papier de dérivés de fluorescence bleu-mauve réduisant NO_3Ag am., que nous avons identifiés au 5,6-dihydroxyindole et à son dérivé 2-carboxylique (voir paragraphe sur les étapes de la mélanogénèse catalysée par les tyrosinases).

Exemple

— 1 ml de dopa 5 mM dans HCl 0,01 N + 1 ml de tampon phosphate 0,1 M pH 6,8 + 0,5 ml de H_2O_2 à 0,02 % + 0,1 ml d'enzyme à 0,1 % (100 µg).

— *Chromatogramme* W_1 BA : temps 45 min., 50 µl pour NO_3Ag am., 100 µl pour la ninhydrine, et dopa correspondant à 25 % de la quantité initiale, révélée à la ninhydrine.

— *Résultats :* En lumière de Wood, on observe les deux fluorescences dues aux dérivés indoliques, qui sont révélés par NO_3Ag am. ainsi que la dopa résiduelle. D'après la révélation à la ninhydrine, il reste un peu plus de 25 % de la dopa après 45 min. de réaction.

Le lendemain, l'essai est devenu incolore et contient des grains noirs de mélanines.

Nous avons vérifié le parallélisme de l'action des deux enzymes sur les *o*-diphénols en utilisant le catéchol. Les dérivés hydroxylés du diphényle et un pigment brun sont observés dans les deux cas [Cf. 17 *bis*].

b) **Avec la 3'-hydroxythyronine :**

En solution diluée (concentration inférieure à 0,25 mM) l'hydroxythyronine est rapidement consommée par les quantités d'eau oxygénée et de peroxydase utilisées dans les expériences sur la Thy. Elle aurait donc pu être un intermédiaire fugace dans les oxydations de Thy, comme nous l'avons noté plus haut.

Mais, utilisant une solution d'hydroxythyronine environ 2,5 mM, nous n'avons pu mettre en évidence aucun composé donnant la réaction à la ninhydrine à part la tyrosine (qui d'ailleurs se forme en présence d'eau oxygénée même en l'absence d'enzyme). En particulier nous n'avons pas rencontré de composés pouvant être identifiés à T ou à P.

Ceci confirme nos précédentes conclusions : l'oxydation des monophénols catalysée par la peroxydase ne conduit pas à l'*ortho*-diphénol correspondant.

Nous pouvons noter à ce propos que dans nos essais de la peroxydase Bios, abandonnée à cause de sa faible activité, nous avions constaté (milieu non tamponné) la formation de dopa à partir de tyrosine ; à partir de thyronine, apparaissaient des substances réductrices — révélées par NO_3Ag am. — de même Rf en BA que l'hydroxythyronine et l'hydroquinone (0,42 et 0,8). Cette peroxydase probablement moins pure n'avait donc pas le même type d'action que la peroxydase Worthington. Cependant, elle ne contenait pas d'oxydase susceptible d'agir sur la Thy en l'absence d'eau oxygénée, comme il ressort d'un témoin où l'eau oxygénée était remplacée par de l'eau.

ACTION DE LA MYELOPEROXYDASE SUR LES PHENOLS

A cause de la très faible activité de l'enzyme lorsqu'il nous est parvenu, nous n'avons fait que quelques expériences-clefs destinées

à déterminer si l'action de l'enzyme d'origine animale ressemblait à celle de la peroxydase de raifort Worthington. Les conditions expérimentales ont été décrites dans le chapitre II.

Avec la thyronine (à pH 5,7, 6,8 ou 7,4), nous retrouvons le même composé blanc P insoluble dans l'eau à pH 5-6 et le même composé intermédiaire T.

Avec la DIT (pH 7,4), il se forme des iodures et les composés iodés restant au point de départ, et compris entre le départ et les iodures en BA.

Avec la 3,5,3'-T_3 (pH 5,7) nous trouvons des iodures, de la DIT, les composés restant au départ en BA et en eau. Le composé X est le plus souvent difficile à individualiser dans une traînée partant du point de dépôt et ne migrant pas en eau. Il nous a semblé le distinguer de manière certaine quelques fois cependant.

Un fait étonnant est que la T_3 radioactive marquée uniquement en 3' conduit à de la DIT radioactive. Nous avons supposé que de la tyrosine ou de la MIT présentes comme impuretés de la T_3 avaient été iodées avec les iodures radioactifs provenant de la T_3 par désiodation. Mais 250 µl de T_3 triturée dans l'eau chaude (2 mg pour 0,5 ml) ne contiennent ni Tyr ni MIT décelables après chromatographie en BA (sensibilité de la ninhydrine ; 1 µg de Tyr ; sensibilité du réactif cérique : quelques dixièmes de µg de MIT ou de DIT). Par contre, on trouve de faibles quantités de DIT. Notons que la suspension de T_3 utilisée pour nos expériences est de 1,5 mg dans 10 ml d'eau, et les prises de 50 à 200 µl.

Est-ce que la très grande sensibilité de la radio-autographie suffit à expliquer la détection de DIT marquée provenant de MIT ou de Tyr en quantités indécelables ? Faut-il penser à une impureté de la T_3 marquée ? Une substance de même Rf que la T_3 en BA migre légèrement plus en eau ; c'est la seule substance radioactive avec les iodures, présente dans les témoins de T_3*.

Dans la T_3 ordinaire commerciale, une substance iodée de comportement chromatographique identique est présente aussi à l'état de traces.

TYROSINASES

I. — Activité de type «tyrosinase» dans le mélanome de HARDING-PASSEY : Action sur la thyronine et les thyronines iodées.

L'utilisation de la **thyronine** comme substrat a permis de caractériser dans une préparation brute de mélanome de souris une activité de même type que celle de la ppo de champignon purifiée, non seulement par la disparition de la thyronine, mais aussi par la mise en évidence des mêmes produits de réaction en présence de l'enzyme de mammifère ou de l'enzyme végétal (ppoKZ).

La thyronine est oxydée par le mélanome en donnant de la 3'-hydroxythyronine et de la tyrosine, mises en évidence par la chromatographie sur papier. La thyronine disparaît plus ou moins rapidement selon la quantité de mélanome mise en œuvre et le pH.

Exemple 1

— *Essai :* 1 ml de Thy 2,5 mM dans l'eau + 0,5 ml d'extrait acellulaire de mélanome dans un tampon phosphate 0,1 M, pH 6,8 (100 mg de poudre par ml). Dans un erlen bouché avec canne de verre. Agitation mécanique, à 37° C., 1 h.

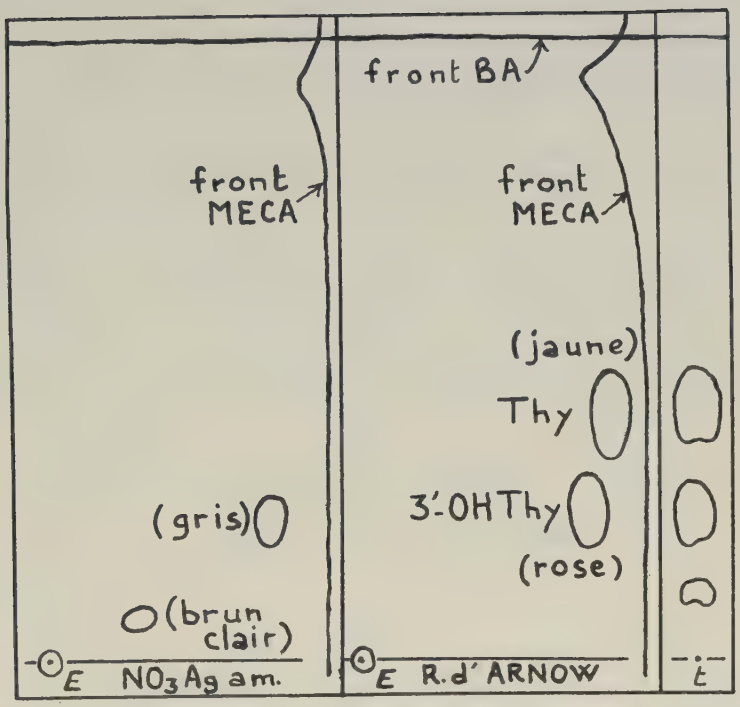


FIG. 7. — Chromatogrammes bidimensionnels pour caractériser la 3'-hydroxythyronine (OHThy) dans le milieu d'oxydation de la Thy par le mélanome. Détails expérimentaux dans le texte. En E : 100 µl de l'essai au temps 40 min. ; en t : mélange de Thy, OHThy et Tyr. Les taches de départ sont brunes (débris tissulaires et mélanines).

— *Chromatogramme* W_1 BA : 15 µl de l'essai ; gamme de Thy correspondant à 100, 75, 50, 20 et 10 % de la quantité initiale.

— *Résultat :* Il reste dans l'essai environ 20 % de la Thy initiale. Tache nette de Tyr (quantité non évaluée).

Exemple 2

— *Essai :* mêmes conditions, sauf que la poudre de mélanome a été extraite par du tampon de pH 7,4.

— *Chromatogramme :* W_1 BA. 15 µl de l'essai. Gamme de Thy. Point témoin de Tyr : 2 µg.

— *Résultat.* Thy : pas de tache individualisée ; il n'en reste que très peu ou pas du tout. Tyr : tache correspondant à la tache témoin ; donc environ 2 µg.

Dans les mêmes conditions un extrait correspondant à 50 mg de poudre par ml oxyde 75 % du substrat s'il est à pH 7,4, et 50 % s'il est à pH 6,8.

Nous n'avons pas pu mettre en évidence la formation de dopa. Par contre l'hydroxythyronine a été caractérisée avec certitude, après chromatographie en deux dimensions.

Exemple

— *Essai :* 1 ml de Thy 2,5 mM dans un tampon phosphate 0,1 M pH 6,4 + 0,5 ml de suspension de poudre de mélanome dans l'eau (100 mg/2 ml).

— *Témoin :* 1 ml de tampon phosphate de pH 6,4 + 0,5 ml de suspension enzymatique.

Essai et témoin sont dans des fioles de Warburg reliées à des manomètres ne servant que de supports. Agitation mécanique à 37° C.

— *Chromatogrammes :*

a) W_1 BA : milieu de préparation d'hydroxythyronine contenant aussi de la Thy et de la Tyr (servant de témoin au suivant).

b) W_1 BA en 1re dimension, MECA en 2e dimension : 100 µl de l'essai et du témoin aux temps 40 et 90 min. pour le réactif d'Arnow ; prises identiques pour NO_3Ag am.

— *Résultats.* Thy (jaune au réactif d'Arnow) et hydroxythyronine (rose au réactif d'Arnow ; gris au NO_3Ag am.) seulement dans l'essai, et pour les deux prélèvements. Les autres taches sont communes à l'essai et au témoin (dont une brun clair au NO_3Ag am. migrant à peu près comme la dopa, mais ne donnant pas la réaction d'Arnow contrairement à cette dernière) (fig. 7).

Ces résultats montrent que la Thy est oxydée selon un processus identique par le mélanome et par la ppo végétale hautement purifiée de Kertesz et Zito : hydroxylation en *ortho* de la fonction phénolique libre et rupture du pont phényléther. La partie quinonique résultant de cette rupture n'a pas été retrouvée. Elle se combine très vraisemblablement aux protéines et acides aminés présents dans le milieu. Les pigments aminoquinones ainsi formés pourraient être responsables, avec le dopachrome probablement présent, de la coloration rose des essais au cours des premières heures de l'oxydation.

Nos essais d'oxydation de **thyronines iodées** (à pH 6,8 ou 7,4) ont porté sur la 3-T_1, la 3'-T_1 et la 3'-T_1*, la 3,3'-T_2*, la 3,5-T_2, la 3'3',5'-T_3*, la 3,5,3'T-$_3$*, la T_4*. Il est très difficile de tirer de ces expériences des conclusions sur l'activité tyrosinasique du mélanome agissant sur ces substrats, à cause de nombreux phénomènes qui viennent perturber l'analyse.

Tout d'abord, les thyronines iodées sont adsorbées sur les débris tissulaires du mélanome. Si une solution assez diluée de substrat est oxydée par une suspension enzymatique, et l'essai centrifugé avant la chromatographie, il n'y a plus du tout de substrat sur les chromatogrammes ; en triturant alors le culot de centrifugation avec de l'eau chaude, ou du BA, on détache une partie du substrat qui passe en solution. Si le substrat est assez concentré (par exemple, 1,25 mM) il n'est pas totalement fixé, et il en reste dans le surnageant. Lorsqu'on utilise un extrait enzymatique acellulaire, le substrat est aussi partiellement fixé ; mais comme il n'est pas nécessaire de centrifuger avant la chromatographie, l'AA ou le BA détachent au moins une partie du substrat pendant la migration. Dans une expérience sur la 3'-T_1, très diluée (0,083 mM) à pH 7,4 avec un extrait acellulaire, le BA n'avait pas détaché assez de substrat pendant la migration pour que l'on ait une tache bien marquée ; une extraction par du butanol après acidification de l'essai par de l'acide acétique pur (pH 3 environ) permet de retrouver la 3'-T_1 après chromatographie de la phase butanolique.

Dans ces conditions, il n'est pas possible de suivre quantitativement une disparition du substrat due à l'action tyrosinasique du mélanome.

D'autre part, l'apparition d'iodures dans les milieux d'oxydation est masquée par leur transformation partielle en composés iodés nouveaux. En effet, les chromatogrammes en BA contiennent une tache légèrement fluorescente de Rf élevé (environ 0,9) correspondant à une tache blanche lors de la révélation cérique. Mais le plus souvent cette tache n'est pas marquée sur le « négatif ». Après quelques semaines de conservation des chromatogrammes (non neutralisés par le bicarbonate), ces taches sont devenues brunes, alors que les autres taches iodées sont restées blanches et le fond jaune. Cette tache est radioactive lorsque les substrats sont marqués à ^{131}I. Ces composés nouveaux sont adsorbés comme les thyronines iodées et détachés partiellement des débris tissulaires par l'eau chaude, le BA ou l'ammoniaque. Les mêmes taches iodées sont observées lorsqu'on ajoute simplement des iodures, marqués ou non, à une préparation de mélanome. Pour cette transformation des iodures, les débris tissulaires semblent plus actifs que les extraits acellulaires.

A cause de ce phénomène la désiodation ne peut, elle non plus, être étudiée quantitativement.

Enfin, dans les expériences sur les substrats radioactifs utilisés en quantité traceuse sans entraîneur, nous avons remarqué que les témoins sans mélanome contenaient paradoxalement moins de substrats que les essais. Nous avons eu l'explication de ce phénomène lorsque l'adsorption de ces thyronines iodées sur le verre a été étudiée par d'autres chercheurs du laboratoire, au cours de travaux sur le métabolisme thyroïdien [112, 118]. L'adsorption est plus importante au pH de l'eau qu'aux pH plus élevés ; elle est particulièrement marquée pour la T_4. La présence de protéines dans les essais limite l'adsorption sur le verre.

Exemple 1

— 3,3'-T_2* sans entraîneur traitée par un extrait acellulaire de pH 6,6 (100 mg/ml) ou 7,4 (50 mg/ml) dans des erlens avec canne de verre à 37° C. Agitation mécanique 6 h. Puis dans une étuve à 37° C. Témoins : substrat en solution dans l'eau ou

dans les tampons correspondants ; portés à 37° C dans les mêmes conditions que les essais.

— *Chromatogrammes :*

a) W_1 AA : Essais aux temps 3 h. 30 min., 24 h. Témoin dans l'eau au temps 3 h. 30 min. Témoins dans les tampons au temps 24 h.

b) W_1 AA et W_1 BA : Essais et témoins dans tampons au temps 3 jours. Révélation par radioautographie.

— *Résultats.* Dans les témoins il reste d'autant plus de substrat que le pH est plus élevé, mais beaucoup moins que dans les premiers temps des essais (adsorption sur le verre). Dans les essais la disparition du substrat est sensible après 24 h. à pH 6,6, et bien marquée après 3 jours à pH 7,4. Les iodures sont un peu plus abondants dans les essais que dans le témoin 3 h. 30 min. et augmentent légèrement en fonction du temps. La radioactivité de la tache de départ dans les essais augmente fortement avec le temps (déjà bien nette pour 3 h. 30 min.). De plus, dans le chromatogramme en BA, on voit les taches frontales bien marquées dans les essais (les témoins contiennent aussi des taches radioactives de même Rf, mais plus faibles).

Exemple 2

T_4* d'une part 3,5,3'-T_3* d'autre part, sans entraîneur, traitées par un extrait acellulaire de pH 7,4 (50 mg de poudre par ml) dans des erlens avec cannes de verre. Agitation mécanique à 37° C pendant 2 h. Puis étuve à 37° C. Témoins : substrats additionnés de tampon de pH 7,4.

— *Chromatogramme* W_1 AA : Essais et témoins aux temps 2 h., 18 h., 42 h. Révélation par radioautographie.

— *Résultats.* La disparition de T_3 et de T_4 est bien nette : il en reste moins de 50 % après 18 h., moins encore après 42 h. Les iodures changent peu (les solutions de T_3 et de T_4 en contenaient déjà). La radioactivité de la tache de départ augmente très nettement avec le temps. Dans les témoins, la T_4 disparaît presque entièrement, la T_3 disparaît peu.

Exemple 3

1 ml de 3-T_1 2,5 mM dans l'eau + 0,5 ml d'extrait acellulaire de mélanome (à partir de 100 mg de poudre par ml de tampon de pH 7,4). Dans un erlen avec canne de verre. Agitation mécanique à 37° C pendant 5 h. 30 min. puis étuve à 37° C.

— *Chromatogramme* W_1 BA : 50 µl de l'essai après 22 h. 30 min. Révélation cérique.

— *Résultats.* A côté de la 3-T_1 résiduelle (Rf = 0,62), tache nette de 3'-hydroxy? 3-iodothyronine (Rf = 0,5), MIT (Rf = 0,3) ; tache de départ (Rf nul) et tache frontale (Rf = 0,94).

Interprétation.

Rappelons tout d'abord les conclusions du travail sur l'oxydation des thyronines iodées par la ppoKZ [113, 114]. La 3-T_1 est oxydée aux mêmes concentrations que la thyronine (par exemple 1,66 mM) en donnant un pigment rouge, de la 3'-hydroxy-3-iodothyronine, de la MIT, mais pas d'iodures. Les 3'-T_1, 3,3'-T_2, 3,5,3'-T_3 ne sont oxydées qu'en solution plus diluée. Ces trois substrats donnent alors des iodures et des pigments iodés qui ne migrent ni en BA ni en AA ; de plus, de la MIT est formée à partir de 3,3'-T_2. La 3,5-T_2 n'est aussi oxydée qu'en solution diluée (8.10^{-5}M) et il se forme de la DIT et des iodures. Les 3',5'-T_2, 3,3',5'-T_3 et T_4 ne sont pas attaquées même en solution 2.10^{-5}M.

Dans nos propres expériences, la disparition du substrat, nette en particulier pour la T_4* et la T_3* des exemples ci-dessus, ne peut pas à notre avis, s'expliquer entièrement par une adsorption sur les

constituants du mélanome car elle est progressive. Cependant on ne peut l'attribuer avec certitude à l'action tyrosinasique du mélanome puisque la préparation brute utilisée peut contenir bien d'autres enzymes, et en particulier des désiodases.

La radioactivité ou la réaction cérique manifestées au niveau des taches de départ peuvent être dues soit aux composés iodés issus des iodures ou au substrat adsorbés sur les constituants du mélanome, soit à la partie quinonique (lorsqu'elle est iodée) détachée par rupture du pont phényléther et combinée ensuite aux groupements aminés des protéines.

Il reste la formation de 3'-hydroxy-3-iodothyronine et de MIT à partir de la 3-T_1, qui ont été identifiées par comparaison de leur Rf en BA avec celui des corps de référence (pour la préparation du dérivé hydroxylé de la 3-T_1 [cf. 117]). C'est en fin de compte une faible preuve de l'action tyrosinasique du mélanome ; cette action est beaucoup mieux démontrée par l'utilisation de thyronine comme substrat.

II. — Quelques données nouvelles sur les étapes de la mélanogénèse.

A) Caractérisation des *ortho*-quinones monocycliques dans l'oxydation par la tyrosinase des phénols a chaîne latérale aminée.

La présence de l'*ortho*-benzoquinone après oxydation du catéchol par la tyrosinase était bien établie [146]. Par analogie, la plupart des auteurs ont considéré que la première étape de l'oxydation de la dopa par cet enzyme était la dopaquinone. Les mesures de potentiel d'oxydoréduction effectuée par Ball et Chen [7] montraient que l'existence du premier produit d'oxydation de l'adrénaline et de la dopa par des agents chimiques — supposé être la quinone correspondante — était très courte : « demi-vie » inférieure au dixième de seconde. Les faits expérimentaux en faveur de l'existence de ces quinones étaient très peu nombreux [Cf. 4, 169] dans le domaine de la physiologie. Certains auteurs contestaient l'existence de ces quinones monocycliques : Polonovski [141, Cf. aussi 41] pensait que la première étape de l'oxydation de la dopa ou de l'adrénaline était une déshydrogénation ayant pour effet de créer un deuxième cycle (dérivé dihydroindolique) ; l'oxydation de ce composé conduisait à l'aminochrome, quinone bicyclique. Il appuyait son hypothèse sur l'absence de dérivés colorés lorsque la 3-hydroxyhordénine, dont l'azote de la chaîne latérale est substitué par deux groupements méthyles, est soumise à l'action de la tyrosinase : la formation d'une quinone colorée n'aurait pas dû être empêchée dans ce cas si le groupement aminé n'intervenait pas dès la première réaction.

Ayant observé au cours d'oxydations par la tyrosinase dans certaines conditions que le milieu prenait une teinte jaune transitoire précédant la teinte rose due à l'aminochrome, nous avons supposé la présence à ce stade de la quinone monocyclique. Nous avons cherché à la caractériser en nous appuyant :

1° sur la comparaison des caractères spectrophotométriques des milieux d'oxydation selon les conditions expérimentales ;

2° sur la régénération du diphénol après quelques minutes d'oxydation ;

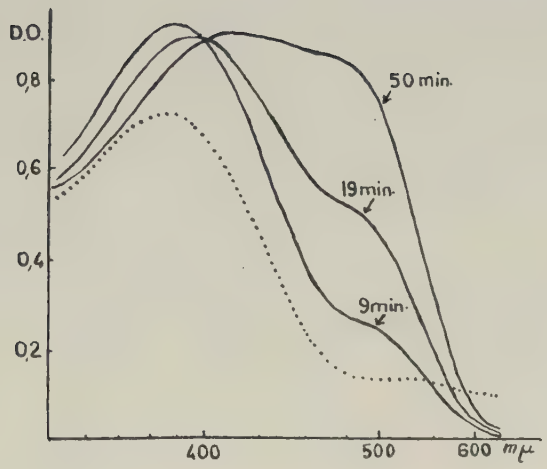


FIG. 8. — Enregistrement du spectre d'un milieu d'oxydation de dopamine par la ppo ; les temps marqués sur les courbes sont comptés à partir de l'addition de l'enzyme (1 ml chlorhydrate de dopamine 5 mM dans l'eau + 5 µl de ppo ; dilué 4 fois dans de l'eau).

En pointillés : spectre de dopamine oxydée par PbO_2 en milieu sulfurique.

3° sur la formation de composés caractéristiques avec la 2,4-dinitrophénylhydrazine.

En utilisant ces mêmes techniques, nous avons voulu vérifier d'abord que la méthode utilisée par RANGIER [144] et RUIZ-GIJON [155] pour obtenir en milieu très acide les quinones de l'adrénaline et de la dopa conduisait bien à ces composés. Déjà BU'LOCK et HARLEY-MASON [30] notant la régénération d'une partie du diphénol oxydé par cette méthode avaient conclu à la présence effective de la quinone, capable de se dismuter ensuite en diphénol et aminochrome.

Dans le but d'arriver à des conclusions mieux établies, nous avons réalisé nos expériences avec un nombre assez grand de phénols : dopa, adrénaline, dopamine, glycyltyrosine pour les oxydations enzymatiques ; dopa, dopamine, adrénaline, 3-hydroxyhordénine pour les oxydations à l'oxyde de plomb en milieu sulfurique. La plupart des indications techniques ont été données dans le chapitre II.

Dans la relations de nos résultats, nous indiquerons le plus souvent avec quels phénols et dans quelles conditions ils ont été obtenus avec une particulière netteté, sans vouloir par là sous-entendre que le comportement des autres phénols est d'une autre nature.

Coloration et spectrophotométrie :

a) Une coloration jaune, puis jaune-orangé précédant la coloration rouge habituelle (aminochrome) a été observée dans certaines oxydations par la ppo : dopa (dans l'eau et à 0°C) et glycyltyrosine (à pH 6,8, température ordinaire) : pendant quelques secondes ; dopamine (dans l'eau, entre 0°C et 15°C) et glycyltyrosine (dans l'eau, température ordinaire) : pendant plusieurs minutes. On trouve alors un maximum d'absorption à 390 mμ [fig. 8] qui passe à 385 mμ si l'on ajoute de l'acide sulfurique (normalité finale : 1 N). Nous utilisons le spectrophotomètre enregistreur, en diluant les essais quatre fois pour suivre l'évolution du maximum à 385-390 mμ, vingt ou trente fois pour la région 200-350 mμ.

b) Dans les oxydations par PbO_2 en milieu sulfurique (dopa, dopamine, adrénaline, hydroxyhordénine), la coloration jaune est stable plusieurs heures, mais la spectrophotométrie nous a montré qu'elle n'est pas due à un seul composé ; le pic initial s'affaiblit et disparaît (se fondant dans une absorption générale plus ou moins importante) en 20 à 60 minutes selon le diphénol envisagé ; en même temps augmente un maximum d'absorption situé entre 258 et 275 mμ selon les cas. Pour les trois premiers phénols cités, le maximum initial caractéristique est situé entre 382 et 386 mμ ; pour l'hydroxyhordénine, il est placé à 360-365 mμ. Dans ce cas il est peut-être déplacé vers les faibles longueurs d'onde par l'absorption due à une autre substance. (cf. fig. 10).

Si le maximum initial sur 385 mμ est bien dû à la quinone monocyclique, il faut admettre la présence d'une autre substance jaune, plus stable que cette quinone. En fait pour les quatre phénols étudiés, on trouve bien par chromatographie dans l'eau un pigment jaune (PJ) migrant en front, dans la plage sulfurique, et qui vire au rose carmin si l'on plonge le chromatogramme dans une solution saturée de bicarbonate de sodium. Ces pigments jaunes sont oxydants (coloration bleue avec le réactif iodure-amidon). Elués par l'eau

(dans le cas de la dopamine et de la dopa) ils donnent une solution acide (acide sulfurique présent au niveau de PJ) qui montre un maximum d'absorption faible vers 380 mμ, et un maximum important vers 258-265 mμ (*). Additionnées d'un léger excès de bicarbonate de sodium (pH 7-8) ces élutions présentent un maximum net à 485 mμ, et un pic important à 273 mμ ; on a alors une coloration rose, qui passe au gris en quelques heures. De plus, dans le cas de la dopa, un pigment rose carmin (PR) se sépare pendant la chromatographie dans l'eau, juste en deçà de la plage sulfurique. Il est révélé par le réactif d'EHRLICH. Il vire au gris peu de temps après le séchage du chromatogramme.

A titre de comparaison, notons que la spectrophotométrie en milieu acide du dopachrome (milieu d'oxydation de dopa par Ag_2O) et de l'adrénachrome pur fait apparaître un maximum placé pour une acidité 1 N à 410 mμ dans le premier cas, à 405 (après une minute) puis 395 mμ (après 3 minutes) dans le second. Les aminochromes disparaissent d'ailleurs en quelques minutes à ce pH.

On trouvera dans le tableau IV quelques caractères de composés rencontrés dans les milieux d'oxydations de dopa par PbO_2 (fig. 9).

Régénération du diphénol :

D'une façon générale une augmentation spontanée de la quantité de diphénol (initialement en grande partie consommé par oxydation) est observée dans les premières minutes suivant la filtration (PbO_2) ou l'acidification (ppo), par chromatographie soit dans le BA (dopamine + ppo) soit dans l'eau (dopamine + ppo ; dopa + PbO_2 - cf. fig. 9). Ceci peut être dû à une dismutation de la quinone, ou à sa réduction par un produit ultérieur.

Cette régénération est accentuée par l'emploi de réducteurs. Après chromatographie dans l'eau (plus séparative que dans le BA) nous l'avons observée notamment : dans le cas de la dopa oxydée par PbO_2 (avec $NaHSO_3$, KI ou poudre de zinc comme réducteurs) ; dans le cas de la dopamine oxydée par la ppo ou par PbO_2 (avec $NaHSO_3$).

EXEMPLE

3 ml de dopa 5 mM dans l'eau, additionnés de 0,1 ml de H_2SO_4 concentré sont oxydés par une pincée de PbO_2. Filtrer entre 30 sec. et 3 min. Ce filtrat est appelé f.

— *Chromatogramme* sur W_1 lavé, en H_2O, révélé par NO_3Ag am. : 5 μl du filtrat déposés à des temps différents, et 5 μl de filtrat réduit par du bisulfite aux temps correspondants : voir le résultat sur la fig. 9.

Le spectre d'une dilution de f au quart dans l'eau, lu au temps 6 min. (appareil enregistreur) présente le pic caractéristique très bien marqué : λ max. : 386 mμ (D.O. = 0,585) ; λ min = 330 mμ (D.O. = 0,378), qui s'atténue peu à peu dans les minutes suivantes.

Au moyen de la spectrophotométrie, en utilisant la réduction cathodique, nous avons vu réapparaître le maximum caractéristique du diphénol dans le cas de l'hydroxyhordénine, de l'adrénaline et de la dopa oxydées par PbO_2 [fig. 10]. Dans les deux premiers cas le pic apparu après réduction est exactement centré sur le maximum

(*) MASON signale un spectre du même type pour les milieux d'oxydation du catéchol, une heure après l'addition de tyrosinase [123 *bis*].

TABLEAU IV

	PJ	PR	I	II	III	DOPA	IV
Rf (pour des prises faibles) ..		0,9	0,9	0,88	0,84	0,72	0,57
Stabilité sur papier	assez stable	→ gris					
Dans les milieux réduits	supprimé	supprimé		diminué	diminué	augmenté	augmenté
NO_3Ag am.			+	+	+	+	+
Ninhydrine						+	+
EHRLICH	—	+				—	—
IK + Amidon	+	+				—	—

Propriétés des corps rencontrés dans la chromatographie en eau des milieux d'oxydation de DOPA par PbO_2. Voir fig. 9 pour la nomenclature. Détails expérimentaux dans le texte. (Pour des prises de 50 µl et plus, la plage sulfurique modifie les Rf les plus élevés.)

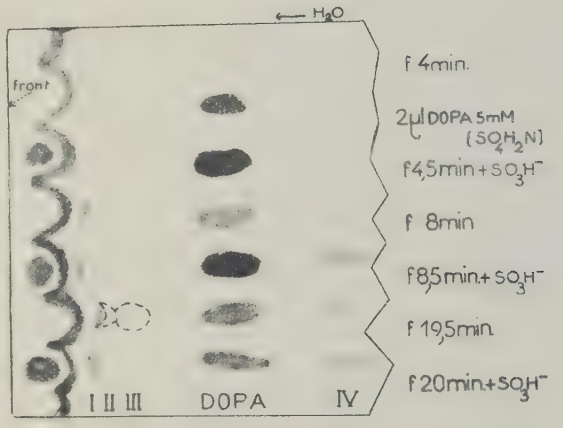


FIG. 9. — Chromatographie dans l'eau d'un milieu d'oxydation de dopa par PbO_2 (f), réduit à des temps différents par $NaHSO_3$. Révélation par NO_3 Ag am. Les tirets placés arbitrairement dans l'essai f 19,5 min. donnent la place des composés II et III obtenus de façon non constante.

relatif au diphénol lui-même ; dans le troisième cas, le spectre est un peu moins probant (pic sur 281-283 mμ au lieu de 279). Ceci est dû peut-être à l'importance des composés secondaires attestée par une grande absorption entre 240 et 280 mμ pour le milieu d'oxydation de la dopa [fig. 10]. Après un certain temps de passage du courant, la température peut atteindre par effet JOULE 70-80°C, ce qui détruit la quinone, PJ, et peut-être d'autres corps. Pour estimer l'effet propre de la réduction, nous avons comparé les spectres du catholyte, de l'anolyte et de l'essai porté à 80°C.

Action de la dinitrophénylhydrazine :

Nous avons décrit dans le chapitre II la formation d'un précipité rouge lorsque de la DNPH est ajoutée aux milieux d'oxydation des phénols. L'analyse chromatographique de ce précipité sépare plusieurs produits colorés. Déjà à ce stade le rapprochement de plusieurs expériences permet de dégager le fait suivant : dans tous les essais où nous soupçonnons la présence d'une quinone monocyclique et dans ceux-là seulement, une tache prédominante, initialement orangé-brique, vire au bleu ou au violet lorsque le chromatogramme est exposé à des vapeurs d'ammoniac ; les autres taches ne virent pas, ou virent au gris ou au brun (de nombreuses taches virent si l'on ajoute un réactif de pH plus élevé : solution de soude ou de carbonate de sodium).

Les taches virant au bleu-violet par l'ammoniac sont trouvées dans les précipités lavés après action de la DNPH sur : la *para*-benzoquinone, le 1,2-naphtoquinone-4-sulfonate de sodium, le catéchol et les 3- et 4-méthylcatéchols oxydés par Ag_2O ou PbO_2, les dopa, dopamine, adrénaline, hydroxyhordénine oxydées par PbO_2 (dans les premières minutes), la glycyltyrosine (DNPH ajoutée par ex. après 3 minutes d'oxydation dans l'eau ou 8 minutes d'oxydation à pH 6,8) et la dopamine (DNPH ajoutée après 15 ou 45 secondes d'oxydation dans l'eau) oxydées par la ppo. Une solution de PJ préparée par élution à partir de dopa ne donne pas avec la DNPH ce composé caractéristique.

D'autre part, nous avons fait le spectre des précipités lavés obtenus avec la DNPH à partir des milieux d'oxydation que nous venons de citer, ainsi qu'à partir d'autres milieux ne devant pas contenir de quinones monocycliques : dopa et adrénaline oxydées par Ag_2O ; adrénochrome pur. Enfin, dans certains cas, nous avons séparé par chromatographie à partir des précipités le produit qui vire au bleu-violet par l'ammoniac et nous en avons fait le spectre (dopa, dopamine et adrénaline oxydées par PbO_2 ; dopamine et glycyltyrosine oxydées par la ppo). Exemples de spectres dans la figure 11. La comparaison des spectres (tableau V) donnés par les précipités à pH acide permet de distinguer trois groupes :

A) Maximum à 450-456 mμ ; épaulement à 391 mμ ; là où l'aminochrome est prédominant.

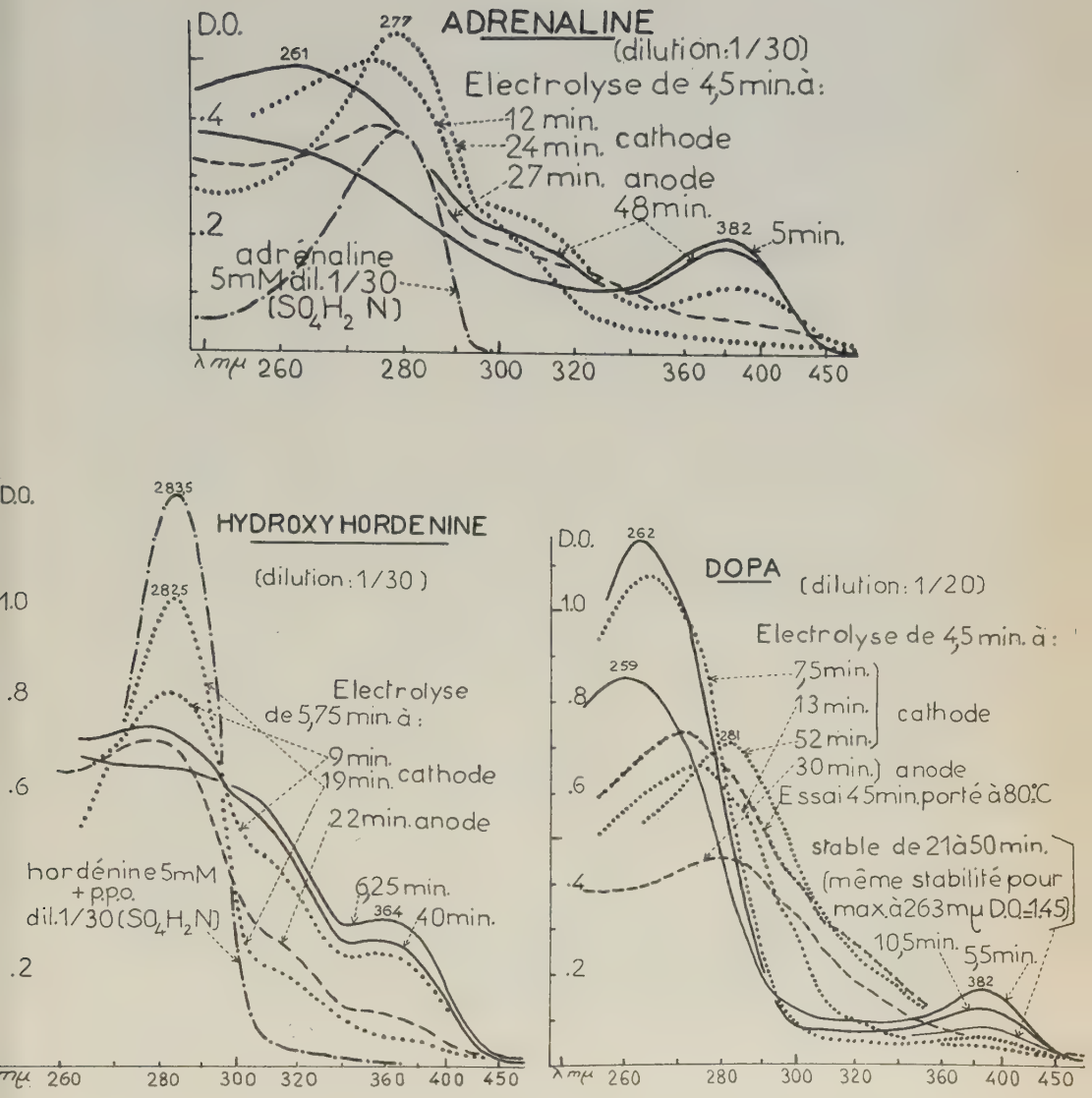


FIG. 10. — Spectres du catholyte (....) et de l'anolyte (— —) dans la réduction cathodique de milieux d'oxydation par PbO_2. En traits pleins, évolution spontanée de ces milieux (temps et dilutions indiqués sur les figures).
Détails expérimentaux dans le texte.

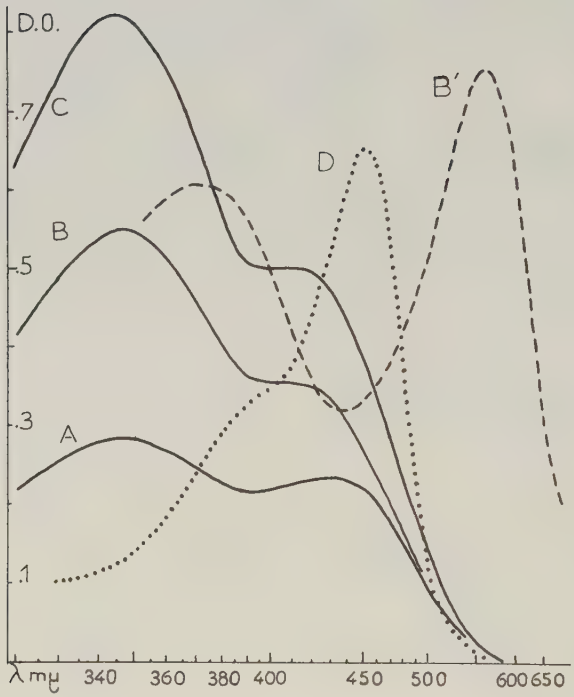


Fig. 11. — Spectres de produits obtenus avec la DNPH (solutions alcooliques) :
A Dopamine + ppo + DNPH : précipité lavé — pH acide.
B Dinitrophénylhydrazone isolée du précipité précédent — pH acide.
B' Même dinitrophénylhydrazone — pH alcalin.
C Dopamine + PbO_2 + DNPH : précipité lavé — pH acide.
D Dopa + Ag_2O + DNPH : précipité lavé — pH acide.

TABLEAU V

Caractères spectrophotométriques des précipités obtenus avec la DNPH. (M, Maximum ; PM, Maximum peu marqué ; E, Epaulement). Les résultats varient peu quand on passe de pH 3 à pH 5 et de pH 9 à pH 13.

Précipités (lavés, puis dissous dans l'alcool) obtenus avec :	pH acide (HCl)			pH alcalin (NaOH)	
	340-370 mμ	370-440 mμ	450-460 mμ		
Adrénochrome pur+DNPH		E 391	M 456	E 465	M 598
Adrénaline+Ag_2O+DNPH		E 391	M 453	E 460	M 598
Dopa+Ag_2O+DNPH		E 391	M 450	M 460	M 580
Dopamine + polyphénol-oxydase + DNPH					
1re préparation	M 355		M 450	M 373	M 580
2e préparation (I)	M 345	PM 430		M 373	M 568
Dopamine = DNPH + polyphénoloxydase (II)		M 382	M 450	PM 432	M 595
Glycyltyrosine + polyphénoloxydase+DNPH (III)	M 353	PM 422		....	M 565
Dopamine+PbO_2+DNPH	M 346	E 409		M 370	M 565
Adrénaline + PbO_2 + DNPH (IV)	M 345	PM 408		M 360	M 562
Dopa+PbO_2+DNPH (V)	M 368	M 431		M 384	M 562
Catéchol + Ag_2O ou PbO_2 + DNPH	M 343	PM 410		M 365	M 560
4-méthylcatéchol + Ag_2O ou PbO_2 + DNPH	M 356	PM 420		M 374	M 569
3-méthylcatéchol + Ag_2O ou PbO_2 + DNPH	M 358	PM 435		M 385	M 585
p-Benzoquinone + DNPH		M 393		E 365	M 551
DNPHone isolée de (I)	M 346	E 408		M 370	M 560
DNPHone isolée de (II)	M 339	E 409		E 370	M 565
DNPHone isolée de (III)	M 341	E 420		....	M 565
DNPHone isolée de (IV)	M 346	E 408		M 370	M 559
DNPHone isolée de (V)	M 346	E 419		PM 365	M 565

B) Maximum vers 345 mμ ; épaulement ou maximum peu marqué vers 410 mμ : là où l'on attend une grande quantité de quinone monocyclique.

C) Maximum entre 340 et 380 mμ et maximum entre 430 et 450 mμ.

Le produit qui vire au bleu-violet par l'ammoniac, isolé des groupes B ou C, donne un spectre de type B. Le type C doit donc résulter de la superposition à la dinitrophénylhydrazone de la quinone, de la dinitrophénylhydrazone de l'aminochrome (oxydations par la ppo) ou d'un corps inconnu (dopa oxydée par PbO_2). En milieu alcalin on note : maximum principal entre 580 et 598 mμ là où existe l'aminochrome, entre 559 et 569 mμ là où domine la quinone monocyclique.

Les dinitrophénylhydrazones des quinones cristallisent en aiguilles rouges groupées en branches de genêt.

Interprétation des résultats :

On ne peut attribuer le maximum d'absorption sur 385 mμ apparu dans les oxydations par PbO_2 aux aminochromes en milieu acide : la régénération du diphénol initial ne s'explique qu'à partir de la quinone de ce diphénol, ou à partir d'un peroxyde (Ar ou Ar - O - O - Ar), et les dérivés obtenus avec la DNPH sont semblables à ceux que donnent les catéchol et méthylcatéchols oxydés qui ne peuvent évidemment pas conduire à une structure de type aminochrome. De plus, pendant l'oxydation enzymatique de la dopamine, alors que le pH initial est de 5,7 environ et diminue ensuite, le maximum sur 390 mμ apparaît dans les premières minutes ; l'apparition ultérieure de l'absorption dans la région de 480 mμ montre bien que l'on a alors, et alors seulement, l'aminochrome [fig. 8].

Il faut donc conclure à la présence d'une substance nouvelle. Quelle structure pourrait-on lui attribuer ?

— une structure peroxydique n'explique pas la formation de dérivés avec la DNPH.

— une structure diphénylique (apparaissant effectivement par condensation radicalaire au cours de l'oxydation du catéchol par exemple [17 *bis*, 52] ne rend pas compte de la régénération du diphénol initial.

— une structure quinonique, avec la chaîne latérale libre, non encore liée au noyau par l'azote, rend compte des deux propriétés ci-dessus qui justement se manifestent dans le milieu au moment où le maximum sur 385-390 mμ est parfaitement net, et disparaissent en même temps que ce maximum. En réalité, il ne nous a pas été possible de relier exactement ces phénomènes par une étude cinétique précise ; ceci en raison principalement de l'absorption générale dans le proche ultra-violet qui croît rapidement et rend illusoire l'évaluation de la densité optique propre du pic caractéristique.

Les pigments jaunes PJ observés après oxydation par PbO_2 en milieu acide sont probablement des polymères de la quinone monocyclique, peut-être de structure diphénylique. Les pigments roses dériveraient de PJ lorsque le milieu devient moins acide (addition de bicarbonate de sodium ou séparation chromatographique de la plage sulfurique). La création de cycles pyrroliques par un mécanisme ressemblant à la formation des aminochromes expliquerait la réaction d'Ehrlich donnée par les pigments roses.

Il faut admettre, à propos de la régénération du diphénol, que les moyens employés pour caractériser celui-ci ne sont pas absolument spécifiques : on peut toujours craindre la présence simultanée d'un composé de même Rf en chromatographie ou absorbant dans la même région de l'ultra-violet que le diphénol. Par contre, l'action de la DNPH a donné des résultats remarquablement concordants pour les oxydations par PbO_2 et par la tyrosinase, avec des produits tout à fait comparables aux dinitrophénylhydrazones de quinones connues. C'est l'argument principal permettant de conclure que le composé transitoire révélé par la spectrophotométrie dans certaines oxydations par la tyrosinase est la quinone monocyclique dérivée directement du phénol utilisé comme substrat.

B) Quelques propriétés des aminochromes. Rôle des dérivés indoliques dans la mélanogénèse.

Parmi les substances rouges formées au cours de l'oxydation des amines et aminoacides diphénoliques, l'adrénochrome est le mieux étudié car le plus stable. Sa structure est celle d'une 2,3-dihydroindole-5,6-quinone [60], ou mieux d'une 2,3-dihydro-6-hydroxyindole-1,5-quinoneimine [73]. Les autres substances rouges (aminochromes) ont été supposées avoir la même structure. Comme arguments existaient [123] l'analogie du spectre d'un milieu d'oxydation de la dopa par la tyrosinase avec le spectre de l'adrénochrome, et la formation dans certaines conditions de 5,6-dihydroxyindole (en l'absence d'oxygène) ou de son dérivé carboxylique (en milieu acide) à partir de milieux d'oxydation de la dopa par Ag_2O, contenant du dopachrome. Nous avons cherché à vérifier la parenté de l'adrénochrome et des autres aminochromes en comparant quelques-unes de leurs propriétés grâce à la chromatographie sur papier et en faisant le spectre de ces produits en solution pure dans l'eau [16].

Lorsqu'on effectue la chromatographie en eau d'un milieu d'oxydation de dopa, les deux taches de fluorescence bleu-mauve trouvées sont d'autant plus importantes et le pigment rouge d'autant moins abondant que l'attente sur le papier a été plus longue avant la migration. D'autre part la quantité de composés fluorescents augmente en fonction du temps dans le milieu d'oxydation par la ppo ou le filtrat après oxydation par Ag_2O, alors que la coloration rouge s'affaiblit. Si le dépôt sur papier après quelques minutes d'oxydation est suivi immédiatement de la chromatographie dans l'eau, les substances fluorescentes n'apparaissent pas.

Nous avons identifié l'un des deux composés fluorescents au 5,6-dihydroxyindole en comparant ses propriétés chromatographiques à celles du corps de référence (préparé à partir d'un échantillon de 5,6-diacétoxyindole fourni par Beer que nous remercions vivement, en l'hydrolysant selon le protocole décrit par cet auteur [8]). Il est aussi présent après oxydation de la dopamine. Le deuxième composé fluorescent, plus abondant après acidification, absent après oxydation de la dopamine, a été identifié à l'acide 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylique [16].

Nous avons établi que les deux dérivés indoliques présents après oxydation de la dopa pouvaient dériver directement du dopachrome en effectuant une chromatographie bidimensionnelle (eau, puis BA ou eau) avec attente de quelques heures entre les deux migrations [fig. 12]. A partir de la tache rouge (dopachrome) isolée par la première migration se séparent au cours de la deuxième les deux composés fluorescents étudiés et le reste de pigment rouge qui n'a pas été encore détruit (ce dernier n'est pas stable en BA). D'ailleurs l'observation en lumière ultraviolette de dopachrome récemment isolé sur papier le fait apparaître comme une tache opaque ; mais quelque temps après la tache manifeste une fluorescence bleu-mauve.

De façon analogue, le dopaminochrome se transforme en 5,6-dihydroxyindole, le noradrénochrome en 3,5,6-trihydroxyindole et l'adrénochrome en 3,5,6-trihydroxy-N-méthylindole (ou adrénolutine) lorsqu'ils sont laissés quelques heures à sec sur papier. Ce traitement transforme partiellement le dihydroxyindole lui-même en un composé inconnu, de fluorescence bleu-mauve et de Rf nul dans l'eau. D'autres

composés fluorescents ont été mis en évidence dans ces expériences par S. Bouchilloux [16].

Etant donné l'instabilité des aminochromes soit en solution, soit surtout lorsqu'ils sont séchés sur papier, il était impossible d'en préparer des solutions pures par la méthode classique de séparation chromatographique suivie d'élution. En fait, des solutions préparées de cette manière contenaient toujours un peu de dérivés fluorescents, visibles au cours d'une chromatographie de contrôle dans l'eau.

Nous avons adopté la technique suivante : 1 ml ou plus d'un milieu d'oxydation (par la ppo ou par Ag_2O) contenant l'aminochrome est déposé sur une feuille de papier lavé, W_1 ou 3 mm, dont le bord inférieur a été préalablement découpé en dents de scie symétriques. Une chromatographie dans l'eau sépare des autres substances le pigment rouge, peu en arrière du front. On laisse couler le solvant par les dentelures. A mesure que le pigment arrive aux dentelures, on prélève soigneusement les gouttes avec un effilé. On se contente des quelques dizaines de microlitres nécessaires à l'expérience, qui sont immédiatement dilués dans de l'eau pour en faire le spectre à l'appareil enregistreur. Quelques microlitres sont conservés dans l'effilé et, aussitôt après l'enregistrement du spectre, sont portés sur papier lavé et mis à migrer dans l'eau sans sécher le dépôt. L'expérience n'est considérée comme valable que si cette chromatographie de contrôle montre l'absence de dérivés fluorescents ou d'autres substances que l'aminochrome. De plus les feuilles de papier sont séchés et révélées par NO_3Ag am. pour vérifier qu'aucun autre composé que l'aminochrome n'était arrivé au niveau des dentelures où l'on a prélevé l'aminochrome. Enfin, les fractions précédant ou suivant immédiatement la fraction pigmentée utilisée ont été prélevées pour les comparer à cette dernière.

Grâce à cette technique, nous avons pu préciser les maximums de deux aminochromes en solution pure : dopachrome (214, 304, 473 mμ) et dopaminochrome (213, 300, 465 mμ), alors que ceux de l'adrénochrome sont à 220, 301 et 485 mμ et ceux du noradrénochrome à 215, 293, 485 mμ.

En suivant le même protocole, nous avons préparé quelques dizaines de microlitres de dopachrome que nous avons additionnés de quelques cristaux de bisulfite de sodium. Une électrophorèse à pH 6,8 dans un tampon à l'acétate d'ammonium nous a permis de séparer un unique composé de fluorescence jaune, de même migration que le composé unique présent dans le témoin : milieu d'oxydation de dopa par Ag_2O additionné de bisulfite. Ce composé de fluorescence jaune a le même comportement électrophorétique et chromatographique que celui qui est donné par l'adrénochrome pur quand il est traité par du bisulfite. Ces composés d'addition ont été étudiés par S. Bouchilloux [13].

Autre analogie enfin, nous avons déjà vu que la DNPH agissant soit sur l'adrénochrome pur (ou un milieu d'oxydation d'adrénaline par Ag_2O) soit sur le dopachrome présent dans un milieu d'oxydation de dopa par Ag_2O, conduit à des substances dont les spectres sont tout à fait comparables, que ce soit à pH acide ou à pH alcalin.

Cet ensemble de résultats souligne la parenté de l'adrénochrome et des autres aminochromes et confirme que leur structure doit être essentiellement la même. Dans quelle mesure ces structures dihydroindoliques ou indoliques, observées si nettement dans les expériences *in vitro* utilisant un agent d'oxydation chimique ou un enzyme végétal, jouent-elles un rôle dans la formation des mélanines naturelles chez les animaux ?

Un point nouveau dans cette discussion nous a été fourni par l'étude de l'oxydation *in vitro* de la dopa par le mélanome de souris.

Exemple

2 ml de dopa 5 mM, 0,5 ml de tampon phosphate 0,1 M pH 6,8 et 1 ml d'une suspension de mélanome à 100 mg pour 2 ml d'eau, sont placés dans une fiole à ouverture rodée montée sur un manomètre d'un appareil de Warburg comme support. L'agitation est de 100 oscillations/minute et la température de 37° C. On prélève après 11, 33 et 62 minutes (prélèvements 1, 2 et 3) 1 ml de l'essai que l'on extrait par 0,75 ml de *n*-butanol saturé d'eau. Une centrifugation de 10 minutes à 5.000 tours/minute sépare une galette protéique contenant des mélanines, à la limite de la phase butanolique incolore (où nous rechercherons les dérivés indoliques) et de la phase aqueuse rose ou rouge (où nous évaluerons le dopachrome). Les opérations sont effectuées pour chaque prélèvement dans des intervalles de temps à peu près identiques, si bien que la lecture du spectre de la phase aqueuse se place respectivement 19, 22 et 20 minutes après le prélèvement correspondant. Les prélèvements 1 et 3 sont dilués au tiers avec de l'eau pour la lecture, le prélèvement 2 nécessite une dilution au cinquième. D'autre part 100 µl de chaque phase butanolique sont portés en chromatographie (W_1 ; BA). Le chromatogramme est examiné en lumière de Wood, puis révélé par NO_3Ag am. Les résultats sont notés dans le tableau VI.

TABLEAU VI

Comparaison des quantités de dopachrome et de composés indoliques dans l'oxydation de la dopa par le mélanome (détails expérimentaux dans le texte).

	Prélèvement 1	Prélèvement 2	Prélèvement 3
DHI	absent	traces (NO_3Ag am.)	net (NO_3Ag am. et fluoresc.)
2-carboxy-DHI	traces (fluorescence)	traces (fluorescence)	traces (fluoresc. et NO_3Ag am.)
dopa	quantité importante	faible quantité	traces
D.O. sur 465 mµ (max.)	1,380×3=4,140	1,300×5=6,500	1,600×3=5,040
D.O. vers 380 mµ (min.)	0,800×3=2,400	0,770×5=3,850	1,450×3=4,350
Différence	1,740	2,650	0,690

L'augmentation de l'absorption au minimum (vers 380 mµ) étant due à l'apparition de substances autres que le dopachrome la différence de densité optique entre maximum et minimum donne une idée de la quantité de dopachrome présent. Il est manifeste que c'est pour le prélèvement 2 que le dopachrome est le plus abondant ; il en reste peu dans 3. Or c'est dans le prélèvement 3 que les deux dérivés indoliques sont les plus abondants. Ceci prouve que les dérivés indoliques ne sont pas issus du dopachrome au cours de l'extraction par le butanol. D'autre part, ils n'ont pas pu en dériver pendant la chromatographie de la phase butanolique puisque le dopachrome reste dans la phase aqueuse.

Nous pouvons conclure que les deux dérivés indoliques sont effectivement présents dans le milieu d'oxydation de la dopa en présence de mélanome de souris.

III. — Combinaison de quinones d'intérêt biologique avec la cystéine et le glutathion.

A) Oxydation de la dopa et de la tyrosine par la ppo en présence de thiols (GSH et CSH). Comparaison avec la noradrénaline et le catéchol.

1° *Dopa et GSH avec un rapport GSH/dopa de 2 moles/mole :*

Nous avons observé que si l'on oxyde la dopa par la ppo à des pH compris entre 6,0 et 6,8 (tampon phosphates), soit à 37°C, soit à la température du laboratoire, en présence d'un excès suffisant de GSH (2 moles par mole de dopa), les colorations rouge puis noire de la mélanogénèse n'apparaissent pas : le milieu reste incolore (pendant plusieurs semaines au réfrigérateur). Cependant la spectrophotométrie et la chromatographie montrent qu'une réaction a eu lieu, qu'il ne s'agit pas d'une inhibition de l'enzyme : on constate que la dopa disparaît, remplacée par un nouveau composé A qui peut être caractérisé dans le milieu.

Exemple

2 ml de dopa 5 mM + 0,5 ml de tampon phosphate 0,1 M pH 6,8 + 0,2 ml de GSH 0,1 M + 5 µl de ppo (pH de l'essai : 6,5).

Des dilutions au vingtième dans l'eau sont examinées périodiquement au spectrophotomètre. Le spectre de l'essai sans ppo (maximum : 278,5 mµ) est remplacé dès la deuxième minute après l'addition de l'enzyme par un spectre à deux maximums : 256 et 284 mµ, dont l'intensité augmente avec le temps, le deuxième maximum se déplaçant vers 290 mµ. Comme pour toutes les réactions catalysées par la ppo, si le milieu n'est pas suffisamment agité, la vitesse est très ralentie faute d'oxygène. L'absorption de GSH peut être négligée aux longueurs d'onde considérées. Par contre, au-dessous de 300 mµ, il faudrait tenir compte de GSSG s'il s'en formait des quantités appréciables : nous verrons que tel n'est pas le cas.

Parallèlement, la chromatographie sur papier W_1 en BA (prise d'essai 10 à 50 µl) montre la disparition de la dopa. Mais les corps apparus ayant un Rf nul en BA (comme d'ailleurs GSSG), il fallait essayer d'autres solvants. Nous avons adopté la MECA, et parfois la MECF (méthyléthylcétone acétique ou formique), qui mettent en évidence un composé A, souvent seul produit de la réaction, parfois accompagné d'un composé B. A et B réagissent avec la ninhydrine, NO_3Ag am., le réactif d'Arnow, mais pas avec le réactif d'*Ehrlich* (cf. tableau VII) ; ils ne sont donc pas indoliques.

A ayant le même Rf que GSSG dans tous les solvants essayés, et migrant à peu près comme lui en électrophorèse, nous l'avons séparé des traces de GSSG pouvant être présentes en passant le milieu de formation de A sur une colonne d'Activit 50XP [55]. Pour le séparer des petites quantités de B qui l'accompagnent et des traces de dopa résiduelle, l'éluat a été chromatographié sur papier en MECF et la bande de A éluée par de l'eau.

Sur cette solution de A purifié, nous avons confirmé les réactions colorées correspondant aux fonctions α-aminoacides et *o*-diphénols. Le spectre en U.V. [fig. 13] est très voisin de celui du milieu de formation de A.

Cette solution de A est stable pendant plusieurs semaines au réfrigérateur, puis jaunit peu à peu. A est stable à pH acide (jusqu'à pH 2). Une courte alcalinisation ne le détruit pas. Sous l'action de la ppo, le spectre U.V. est très peu modifié et il n'apparaît pas de maximum en visible, on observe seulement l'accentuation du très léger épaulement vers 350 mµ existant dans le spectre de A. Avec l'oxyde d'argent en milieu non tamponné, on obtient avec des quantités décroissantes de

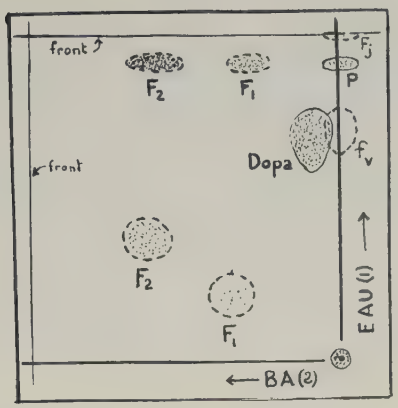


FIG. 12. — Chromatogramme bidimensionnel — eau puis, après quelques heures d'attente, BA — d'un milieu d'oxydation de dopa par Ag_2O. P : pigment rose après la première migration, fluorescence après la deuxième ; F_2 : DHI ; F_1 : 2-carboxy-DHI. Fluorescences en UV cernées par des tirets (fv : fluorescence verte ; Fj : fluorescence jaune). Révélation par NO_3Ag am. Détails expérimentaux dans le texte.

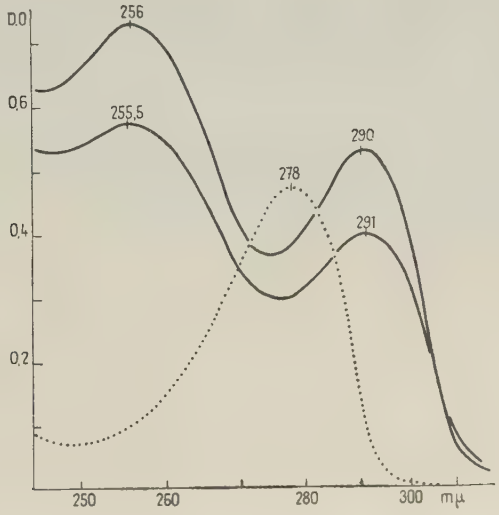


FIG. 13. — Spectre du thioether diphénolique A purifié (— courbe inférieure). Spectre d'un essai d'oxydation de noradrénaline en présence de GSH (2 moles par mole) ; .... dilution au vingtième de : 1 ml de noradrénaline 5 mM + 0,25 ml de GSH 0,1 M (pH final voisin de 6,0) ; — courbe supérieure : même dilution, 1 h. après l'addition de 5 μl de ppo.

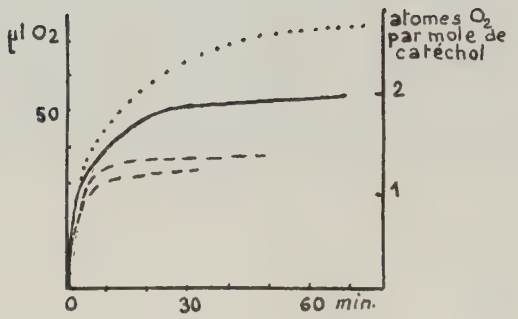


FIG. 14. — Consommation d'oxygène pendant l'oxydation de 2,5 micromoles de catéchol par 20 µl de ppo (24° ; tampon phosphates pH 6,8) en présence de 3 micromoles de GSSG (pointillés), de 3,5 (trait plein) ou 35 (tirets ; deux expériences) microéquivalents de sulfhydryles (ovalbumine).

celui-ci, soit une coloration jaune intense (maximum 410 mμ, avec forte augmentation de l'absorption en U.V.), soit une coloration jaune rosé (maximum 425 mμ et moindre modification en U.V.), soit une coloration rose pâle (maximum 470 mμ, U.V. peu modifié). L'action du bisulfite ou du borohydrure de potassium n'a pas régénéré A à partir de ces milieux d'oxydation.

Les faits observés conduisaient à penser que A était le thioéther résultant d'une combinaison de GSH à la dopaquinone. Un argument supplémentaire a été apporté par l'évaluation de la consommation d'oxygène au cours de la réaction. A pH 6,3 et avec un rapport GSH/dopa de 2/1, elle est de un atomegramme d'oxygène par mole de dopa engagée. Ce résultat, et la très faible consommation d'oxygène par les témoins sans ppo, montrent que l'oxydation de GSH en GSSG est minime dans ces conditions. On a vérifié en fin d'expérience la disparition totale de la dopa par chromatographie en BA.

INTERPRÉTATION :

L'ensemble des résultats exposés ci-dessus suggère le schéma réactionnel suivant :

(1) dopa + 1/2 O_2 $\xrightarrow{\text{ppo}}$ dopaquinone + H_2O

(2) dopaquinone + GSH ⟶ dopa — SG (c'est-à-dire A)

(La réaction (2) est représentée en I de la figure 2.)

2° *Dopa et GSH avec des rapports GSH/dopa nettement inférieurs à 2/1 :*

Nous avons utilisé des rapports compris entre 1/1 et 1,5/1. Pour le rapport 1/1 l'essai rosit en 1 à 2 minutes, devient rouge lie-de-vin en une dizaine de minutes, puis violet, violet noir en une vingtaine de minutes et enfin noir verdâtre. Pour des rapports 1,2/1 et 1,3/1, la teinte rose apparaît un peu plus lentement et son intensité est plus faible. Ensuite l'évolution de la coloration est la même que pour le rapport 1/1. Pour un rapport de 1,5/1 le milieu peut rester incolore quelques heures puis se colorer en jaune-verdâtre ; il noircit après un temps plus ou moins long.

EXEMPLE - GSH/dopa = 1/1

2 ml de dopa 5 mM dans l'eau + 0,1 ml de GSH 0,1 M + 0,5 ml de tampon phosphates 0,1 M pH 6,8 + 5 μl de ppo (pH de l'essai 6,5).

— *Coloration et maximums d'absorption* (mμ) :

10 min. : rouge 257 ; 285,5 ; épaulement à 296 ; 470.
21 min. : lie de vin 257 ; 294 ; 480.
25 min. : lie de vin ; 490.
32 min. : lie de vin ; 257 ; 298.
60 min. : noirâtre à reflets lie de vin ; 120 min. : noir.

On note de plus un épaulement vers 380 mμ tout au long de la réaction. La densité optique augmente beaucoup plus rapidement pour le pic placé entre 285 et 300 mμ que pour le pic sur 257 mμ.

— *Chromatogrammes :*

a) W_1 MECA - Révélé par NO_3Ag am. : 10 μl aux temps 2, 9, 23, 35 min. Pendant le séchage la tache de dépôt devient noirâtre pour les temps 23 et 35 min.

b) W_1 Eau en deux dimensions 50 μl au temps 30 min. Attente de quelques heures entre les deux migrations. Examen des fluorescences. Révélation par NO_3Ag am.

— *Résultats :* La dopa et A diminuent de 2 à 23 minutes et ne sont plus visibles pour 35 min. Les taches de départ de 23 et 35 min. réduisent NO_3Ag am.

En eau, un pigment noir verdâtre se trouve exactement au front, un pigment rose migre en deçà de lui. Pendant l'attente sur papier, le pigment rose donne naissance à du DHI séparé par la deuxième migration, ce qui permet de conclure que ce pigment était du dopachrome. Le pigment noir-vert se retrouve de nouveau juste au front. De plus le chromatogramme contient un peu de DHI déjà présent dans la première migration, une trace de dopa résiduelle, un composé de fluorescence bleu-mauve intense migrant à peu près comme le dopachrome dans les deux migrations (combinaison de l'indolequinone avec GSH comme nous l'indiquerons plus loin), et le composé inconnu de fluorescence mauve abandonné lors de la deuxième migration là où se trouvent le DHI après la première dimension (cf. p. 58). Enfin, 61
un pigment rose migrant comme le dopachrome semble se former pendant la deuxième migration. Dans d'autres expériences (GSH/dopa = 1,5/1 en particulier) nous avons noté l'apparition de ce pigment rose au cours de la migration dans l'eau (se séparerait-il lentement du pigment verdâtre qui le masquait ?) Ce pigment reste rose pendant plusieurs jours sur papier, contrairement au dopachrome qui se transforme en DHI. Ce pigment inconnu réagit très rapidement et très nettement avec le réactif d'Ehrlich (le dopachrome réagit lentement : il doit d'abord se réarranger en composés indoliques).

Exemple : GSH/dopa = 1,5/1.

2 ml de dopa 5 mM dans l'eau + 0,15 ml de GSH 0,1 M + 0,45 ml de tampon phosphates 0,1 M pH 6,8 + 10 µl de ppo (pH de l'essai : 6,2).

— *Coloration et maximums d'absorption* (mµ) :

Jusqu'au temps 25 min. : coloration jaune rosé très faible apparaissant dès l'addition de la ppo et restant identique pendant toute cette période. Le spectre en visible ne présente alors qu'un faible épaulement vers 460 mµ. Pour 23 min. faible épaulement vers 370 mµ qui persistera ensuite.

Avant l'addition de ppo : 278,5.
3 min. : 256 ; 289.
15 min. : 257 ; 288.
23 min. : 258 ; 282 et 287.

Au temps 28 min. la teinte est rose avec un peu de gris.
32 min. : 258 ; 281 et 287.
35 min. : lie de vin rose 480 ; faible épaulement vers 580.
41 min. : 257 ; maximum aplati 282-284.
45-55 min. : noir à reflets lie de vin.
58 min. : pratiquement noir ; 257 ; 284.
70 min. : noir ; 81 min. : 480 plus important que 580.
88 min. : 257 ; maximum aplati 283-285.
4 h. 30 min. : noir à reflets bleus 256 ; maximum aplati 283-285 ; 480 moins important que 590.

Dans les deux exemples ci-dessus, les spectres sont déterminés sur l'essai non dilué pour le visible, et sur une dilution au vingtième pour l'ultraviolet.

Interprétation :

En présence de GSH la dopaquinone formée dans la réaction enzymatique peut suivre deux voies : soit se combiner à une molécule de GSH pour donner le thioéther A, soit se transformer par réaction interne en leucodopachrome, comme dans la mélanogénèse normale. Il y a compétition entre ces deux possibilités.

Pour un rapport de 2 moles de GSH pour une mole de dopa, la concentration en GSH est suffisante pour que toutes les molécules de dopaquinone soient captées avant de pouvoir se transformer en leucodopachrome. Pour un rapport de 1/1 au contraire, une certaine proportion des molécules de dopaquinone formées échappent à la combinaison avec GSH, et le milieu se colore en rose très rapidement, comme en l'absence de GSH. Cependant une certaine quantité de thioéther incolore A s'est formée, qu'on met en évidence soit par chromatographie, soit par spectrophotométrie. Le déplacement du

maximum d'absorption de 285 mμ (résultante de l'absorption de la dopa résiduelle et de A formé) vers 300 mμ peut traduire l'augmentation de la concentration en dopachrome et en DHI (possédant un maximum à 305 et 297 mμ respectivement). Alors que le thioéther A est très stable en lui-même, et se conserve plusieurs semaines en solution pure, il disparaît en une demi-heure environ du milieu où il coexiste avec le dopachrome et les produits ultérieurs de l'oxydation de la dopa. Ceci peut être dû soit à sa polymérisation avec l'un des produits quinoniques présents dans le milieu, soit à son oxydation par ces produits, suivie d'une copolymérisation. De toute façon, il est vraisemblable que la copolymérisation peut aussi bien avoir lieu avec le thioéther issu de la combinaison de GSH avec l'indolequinone une fois que ce thioéther s'est oxydé spontanément.

Comment expliquer les phénomènes observés pour un rapport de 1,5/1 : stade presque incolore pendant plusieurs dizaines de minutes, puis apparition brusque d'une coloration qui évolue rapidement vers le noir. Lorsque du GSH disparaît du milieu par combinaison avec la dopaquinone, il disparaît en même temps son équivalent en dopa. Donc le rapport GSH/dopa ne fait qu'augmenter au cours de la réaction. Mais pour étudier la cinétique des réactions, on doit considérer la concentration des corps réagissant. Soit v_1 la vitesse de l'oxydation de la dopa en dopaquinone et v_2 la vitesse de la réaction de GSH avec la dopaquinone ; v_1 va aller en diminuant puisque la concentration de la dopa diminue (de plus la ppo se dénature partiellement en cours de réaction, ce qui tend aussi à diminuer v_1 ; la pression de l'oxygène par contre est constante). Du fait que la concentration en GSH diminue aussi, v_2 va diminuer de son côté (la concentration de la dopaquinone influence v_2 au même titre que celle de GSH ; il n'est pas possible de l'évaluer). De la valeur relative de v_1 et v_2 va dépendre l'allure des phénomènes observés. Dans nos expériences où le rapport GSH/dopa était de 1/1, la concentration de GSH était telle que d'emblée v_2 était inférieur à v_1 : les molécules de dopaquinone étant plus vite formées que combinées par GSH, une partie se trouvait libre pour suivre la voie de la mélanogénèse normale. Au contraire, dans les expériences où ce rapport était de 1,5/1 la concentration initiale de GSH était suffisante pour que v_2 soit supérieur à v_1 au début de la réaction (stade incolore car la vitesse de combinaison de la dopaquinone à GSH est supérieure à sa vitesse de formation) ; mais supposons que v_2, diminuant plus rapidement que v_1, devienne plus petit que v_1 ; il y a brusque apparition de la coloration due au dopachrome, pour une certaine valeur de la concentration de GSH. L'évolution est ensuite parallèle à celle des milieux d'oxydation où le rapport initial était de 1/1 (notons que la spectrophotométrie témoigne de l'apparition pendant le stade incolore d'un composé inconnu ayant un maximum d'absorption vers 280 mμ). Dans les expériences où le rapport initial était de 2/1, la quantité de GSH était suffisante pour que cette valeur critique ne soit pas atteinte avant que toute la dopa n'ait été oxydée, transformée ainsi totalement en thioéther A.

3° *Dopa et CSH avec des rapports CSH/dopa compris entre 2/1 et 1/1 :*

Les phénomènes observés sont très comparables à ceux que nous venons d'exposer pour GSH. Cependant, même avec un rapport

CSH/dopa de 2/1, il apparaît rapidement après l'addition de ppo une coloration jaune très pâle, puis jaune clair. La spectrophotométrie indique pour les rapports CSH/dopa de 2/1 l'apparition de deux maximums : 291 et 253 mμ. La chromatographie sur papier en BA puis MECA sépare un composé analogue à A, dont on peut admettre qu'il est le thioéther dopa-SC [Cf. tableau VII].

4° *Tyrosine et GSH, avec un rapport GSH/Tyr égal à 2/1 :*

Dans des conditions identiques à celles que nous avons adoptées pour la dopa, à ceci près qu'on utilise une solution de Tyr 2,5 mM au lieu de 5 mM pour la dopa, et avec un rapport thiol/substrat de 2/1, la réaction est beaucoup plus lente, même en augmentant la quantité de ppo. La spectrophotométrie, la chromatographie sur papier et la manométrie indiquent la formation du thioéther dopa-SG. Dans des conditions convenables on observe la transformation totale de la tyrosine en dopa-SG.

5° *Noradrénaline et GSH :*

Ayant pensé que les expériences de Roston [153] (voir discussion) avec l'adrénaline et la noradrénaline oxydées en présence de quantités variables de GSH et de CSH, étaient à rapprocher de celles que nous venons de décrire, nous avons cherché à le vérifier en ce qui concerne la noradrénaline et GSH.

— Pour un rapport GSH/noradrénaline de 2/1, les conditions étant les mêmes que pour la dopa, le milieu reste incolore. Le spectre dû à la catécholamine (maximum à 278 mμ) est remplacé très rapidement par deux maximums à 290 et 256 mμ, avec un minimum à 275 mμ [fig. 13]. La noradrénaline disparaît (chromatographie), remplacée par un composé de caractères très voisins de A dont on peut admettre qu'il est la noradrénaline-SG.

— Pour un rapport GSH/ noradrénaline de 1/1, l'essai se colore assez vite en rose, puis rouge-brun, puis brun. La chromatographie en eau sur papier lavé, pratiquée rapidement montre que le pigment rouge est le noradrénochrome ; on observe également une ou plusieurs substances de fluorescence jaune subfrontales (Rf. 0,95). La chromatographie en MECA montre que la disparition de la noradrénaline est un peu moins rapide que pour un rapport de 2/1 et que le thioéther se forme en quantité moins importante. On observe deux substances non identifiées de fluorescence jaune ou jaune rosé (Rf 0,20 et 0,35 en MECA), dont la quantité diminue en fonction du temps. Nous n'avons pas rencontré de 5,6-dihydroxyindole-SG, composé pourtant susceptible de se former par action de GSH sur le noradrénochrome. En effet, un excès de GSH ajouté à une solution tamponné de noradrénochrome (pH final entre 5,5 et 6,0) conduit à la formation de DHI et de 5,6-dihydroxyindole-SG, successivement. Les faits sont analogues avec l'adrénochrome : la substance signalée par Heacock [75], de Rf 0,61 en acide acétique dilué, est très certainement le thioéther indolique correspondant. Une interprétation satisfaisante des faits observés pour un rapport GSH/noradrénaline de 1/1 nécessiterait d'autres expériences. On peut cependant conclure à une relative analogie avec la dopa et GSH.

6° *Catéchol et GSH :*

Quelques expériences nous ont permis de recouper les résultats

de Pryor [142] et de Mason [124], et de les compléter par l'analyse chromatographique :

— avec un rapport GSH/catéchol de 2/1, à pH voisin de 6,0, le maximum du catéchol (274 mμ) est remplacé par deux maximums : 254 et 284 mμ, le milieu restant incolore (résultats analogues aux observations des auteurs cités ci-dessus). La chromatographie sur papier montre l'apparition d'un composé I [cf. tableau VII] issu très certainement de l'addition d'une molécule de GSH à une d'*ortho*-benzoquinone, et d'un composé II, moins abondant que I, mais en proportion plus grande que B dans le cas de la dopa.

— avec un rapport GSH/catéchol compris entre 1/1 et 1,5/1, à pH voisin de 6,0, on observe à la fois un pigment mauve, qui a tendance à se former à la surface du liquide si celui-ci est mal agité, et un pigment jaune. Ce dernier pourrait être en partie au moins la diphénylènedioxyde-2,3-quinone caractérisée par Forsyth et coll. [52]. La spectrophotométrie indique deux maximums : 390 et 540 mμ dans le visible. La coloration mauve avait été attribuée par les auteurs américains à l'oxydation par un excès de benzoquinone du thioéther (composé I) formé dans un premier temps. Mais nous avons observé sur des essais où le rapport thiol/substrat avait été de 2/1 que le thioéther, sans doute par autoxydation, devenait jaune avec le temps, comme A (dopa-SG). On peut penser que, lorsque la concentration en groupements sulfhydryles n'est pas suffisante, une partie de l'*o*-benzoquinone et peut-être du composé de Forsyth est susceptible de réagir avec les groupements $-NH_2$ du glutathion libre ou déjà combiné, en conduisant à des pigments du type amino-quinone de coloration pourpre.

B) Oxydation des 5,6-dihydroxyindoles par la ppo en présence de glutathion. Action du glutathion sur le dopachrome.

Cette partie du travail a été réalisée en presque totalité par S. Bouchilloux [17] ; nous en exposons les résultats essentiels qui sont utiles pour comprendre ce que nous avons présenté ci-dessus.

1° *5,6-dihydroxyindole et GSH :*

Si l'on oxyde le 5,6-dihydroxyindole (DHI) par la ppo à des pH compris entre 6,0 et 6,8, soit à la température du laboratoire, soit à 37°C, en présence d'un excès suffisant de GSH, le milieu reste incolore pendant un temps assez long (plusieurs heures). Ensuite, même au réfrigérateur et pour des rapports thiol/substrat élevés, il apparaît un pigment bleu-vert puis vert-gris, enfin vert noirâtre (par exemple après quelques jours pour un rapport 5/1).

Par spectrophotométrie directe de milieux de concentration faible (pH 6,8) on constate avec un rapport GSH/substrat de 2/1 le remplacement rapide des maximums de DHI (297 et 273 mμ) par deux maximums à 307 et 295 mμ, avec un minimum à 260 mμ. La réaction est totale en quelques minutes. Mais assez vite ensuite une coloration bleu-vert pâle est perceptible. Le lendemain, l'essai conservé au réfrigérateur est vert-clair : il présente un maximum sur 615 mμ ainsi qu'un contrefort sur 390 mμ. Avec un rapport de 1/1, les modifications spectrophotométriques immédiates sont peu différentes, mais on perçoit dès les premières minutes une coloration bleue, puis bleu-vert. Le lendemain l'essai est vert-gris et quelques jours plus tard gris-vert.

La spectrophotométrie effectuée sur des dilutions d'essais plus concentrés donne des résultats concordants. Des essais où le rapport a été de 5/1, après quelques jours au réfrigérateur présentent des maximums situés à 610-620 mμ, 360-390 mμ et 310-330 mμ.

La chromatographie sur papier a été pratiquée avec des milieux plus concentrés (1 mM, à pH 6,2, avec un rapport GSH/substrat de 5/1 ; prises d'essai de 100 ou 150 μl). Après l'addition de ppo, on constate une disparition rapide du DHI et la formation d'un composé α prédominant, *ortho*-dipydroxylé, acide α-aminé et indolique (tableau VII). Un autre composé indolique et réducteur, beaucoup moins abondant, β, est le plus souvent présent (tableau VII).

La manométrie a été effectuée à pH 6,2 en présence de 5 molécules de GSH pour une de substrat. On peut conclure à la consommation de un atome d'oxygène par molécule de DHI engagé, bien que la courbe ne présente pas un changement de pente aussi net que pour la dopa et GSH, à cause de l'oxydabilité du composé formé.

Les faits observés conduisent à admettre que le glutathion se combine à l'indole-5,6-quinone comme il le fait avec la dopaquinone :

5,6-dihydroxyindole + 1/2 O_2 $\xrightarrow{\text{ppo}}$ indole-5,6-quinone (sans doute sous forme de quinone-imine) + H_2 O.

indole-5,6-quinone + GSH $\longrightarrow$ thioéther α (dont la structure la plus probable est portée dans la réaction I, fig. 2) Nous savons seulement de l'oxydation ultérieure de ce composé qu'elle se fait spontanément à l'air et conduit à un pigment vert puis vert-noirâtre, très soluble dans l'eau, résultant probablement d'une polymérisation. Le borohydrure de potassium et le bisulfite de sodium décolorent ce pigment sans régénérer α.

2° *2-carboxy-5,6-dihydroxyindole et GSH :*

Ces expériences ont été conduites dans des conditions non quantitatives, en attribuant arbitrairement au 2-carboxy-5,6-dihydroxyindole le même coefficient d'absorption sur 311 mμ que celui du DHI sur 298 mμ. La quantité de GSH introduite correspondait à cinq fois cette molarité arbitraire. Dans ces conditions il a été constaté à pH 6,2, après l'addition de ppo, comme avec la dopa et DHI, une rapide disparition du substrat et la formation d'un composé nouveau α', décelé par spectrophotométrie et chromatographie, plus stable que celui qui correspond à DHI. En milieu dilué, on note que deux maximums rapprochés (320 et 312 mμ ; minimum sur 275 mμ) remplacent ceux du substrat (310 et 293 mμ). Un milieu plus concentré chromatographié sur papier montre la disparition du substrat et la formation d'un composé prédominant α', accompagné de β' beaucoup moins abondant (tableau VII).

On peut admettre que α', dont les caractères chromatographiques sont très voisins de ceux de α, est le thioéther diphénolique correspondant au carboxydihydroxyindole. Son oxydabilité n'a pas été étudiée ; les essais précédents qui le contiennent peuvent rester incolores plusieurs semaines au réfrigérateur.

3° *GSH ajouté en excès au dopachrome :*

Un peu de dopachrome pur est obtenu en solution dans l'eau après séparation sur papier lavé. On lui ajoute un peu de tampon

phosphates 0,1 M de pH 6,8 et un excès de GSH (pH final 5,0). Le dopachrome se décolore en quelques heures. La chromatographie pratiquée après trois heures de réaction (coloration jaune-rose) et en divers solvants montre la présence de 5,6-dihydroxyindole, de 2-carboxy-5,6-dihydroxyindole, et d'une importante proportion d'un composé ayant les caractères de α ou α'. Une faible quantité d'une substance ressemblant à β ou β' est observée en MECA.

On peut donc conclure que le dopachrome en présence de GSH se réarrange en les deux dérivés indoliques qui, une fois oxydés spontanément en leurs quinones, se combinent à GSH. Un essai similaire avec un filtrat de dopa oxydée par Ag_2O à pH 6,8 additionné de GSH (pH final 5,7) a conduit aux mêmes résultats.

IV. — **Oxydation du catéchol, de la dopa et du 5,6-dihydroxyindole en présence de protéines.**

L'hypothèse avancée pour expliquer l'association des mélanines naturelles issues de dopa ou de tyrosine à des protéines, était l'existence de liaisons covalentes formées par réaction de l'indole-5,6-quinone avec les groupements sulfhydrylés libres de ces protéines [127]. Nous avons essayé de vérifier cette hypothèse, en oxydant par de la ppo, de la dopa ou du 5,6-dihydroxyindole en présence de protéines assez bien définies : sérumalbumine de bœuf ou ovalbumine commerciales. Notons que les protéines étroitement associées aux mélanines des animaux supérieurs ne sont pas des kératines [62, 159] : ces deux substances sont élaborées dans des cellules différentes, et les granules de mélanine sortent du mélanocyte avec leur structure définitive pour se placer dans les cellules kératogènes.

L'importante concentration en protéines nécessaire pour atteindre les mêmes rapports -SH/substrat que dans les expériences relatives au glutathion, rend malaisées l'analyse chromatographique et la manométrie, et impossible la spectrophotométrie. C'est ainsi que les prises d'essais destinées à la chromatographie (en eau) ou à l'électrophorèse sur papier ne sont pas séchées entièrement sinon les protéines se redissolvent mal en cours de migration.

Des expériences où le catéchol a été oxydé en présence de protéines sont intéressantes à décrire à titre de comparaison.

1° Oxydation du catéchol en présence de sérumalbumine ou d'ovalbumine

En présence de ces protéines, l'oxydation du catéchol conduit en général à une coloration rouge analogue à celle des pigments aminoquinones, mais stable plus longtemps (plusieurs jours même à la température ordinaire). Le milieu vire ensuite au brun. Ces observations sont en accord avec celles de plusieurs auteurs [70, 124] décrivant une combinaison des quinones formées à partir du catéchol avec les $-NH_2$ protéiques (réactions II et III de la fig. 2).

Néanmoins lorsque les quantités de protéines sulfhydrylées sont plus importantes, nous avons observé que la coloration était beaucoup plus pâle (plus de dix -SH d'ovalbumine par molécule de catéchol), et même que l'essai restait incolore pendant plus d'une heure (cinq ou dix -SH de sérumalbumine). Ceci permet de penser que les -SH réagissent aussi avec les quinones (Réaction I de la

fig. 2), et d'autant plus que leur concentration est plus grande, en donnant des composés incolores et assez stables.

Dans la chromatographie en eau sur papier, le pigment rouge migre avec la protéine, tout à fait en front. En électrophorèse (tampon véronal pH = 8,6) le pigment formé en présence d'ovalbumine migre au niveau de celle-ci.

La consommation d'oxygène est difficile à déterminer sans ambiguité dans le cas de la sérumalbumine. En effet cette protéine, aux doses utilisées (0,25 ou 0,5 g pour 3 ml) absorbe elle-même de l'oxygène, si bien que l'on n'obtient pas une courbe horizontale pendant l'équilibration. Quand le catéchol est ajouté au mélange de protéine, de tampon et de ppo, on observe une consommation rapide d'oxygène pendant 10 à 15 minutes (dont la vitesse est en fait limitée par la diffusion de l'oxygène dans le liquide des fioles), puis une consommation plus lente, rigoureusement parallèle à celle du mélange sans catéchol. La distance entre ces deux droites correspond à 1,29-1,33 atomegramme d'oxygène par mole de catéchol (trois expériences avec un -SH par molécule de catéchol). Le milieu est rouge foncé et ne contient plus de catéchol (extraction par le butanol et chromatographie). Il est difficile d'expliquer comment 1,3 atome d'oxygène a pu conduire du catéchol à un composé très coloré (d'après les réactions II et III il faudrait 2 atomes). La consommation lente d'oxygène en fin d'expérience doit-elle être rapportée à la réaction III ? La sérumalbumine est-elle capable de céder l'oxygène qu'elle a capté pendant l'équilibration, ou contient-elle un composé capable d'agir comme oxydant après la réaction II ? Nous ne pouvons répondre à ces questions.

L'ovalbumine ne consommant pas d'oxygène, même en présence de ppo, l'interprétation des courbes est plus facile. La figure 14 montre l'action de deux quantités d'ovalbumine. La diminution de la consommation d'oxygène par rapport à l'oxydation en présence de glutathion oxydé GSSG (donc de groupements $-NH_2$) s'explique par la combinaison d'une partie des quinones aux -SH protéiques, conduisant à un thioéther diphénolique incolore qui ne s'oxyde plus (comme dans la réaction I). Dans l'essai contenant le plus de -SH, le milieu reste rose et la consommation d'oxygène se stabilise à 1,17-1,3 atomegramme par mole de catéchol (deux expériences). Le milieu ne contenant plus de catéchol, il ne s'agit pas d'une inhibition de l'enzyme par l'ovalbumine, mais d'une compétition entre les réactions de types I d'une part et II - III d'autre part.

Pour vérifier le rôle des -SH dans l'affaiblissement de la coloration des essais contenant beaucoup de protéines nous avons préparé — à partir de sérumalbumine commerciale purifiée par précipitation à pH 3,8 par du sulfate d'ammonium — de la sérumalbumine dont les -SH sont bloqués par du *p*-chloromercuribenzoate [21]. Après dialyse contre de l'eau et lyophilisation, la protéine purifiée (à raison de cinq -SH par molécule de catéchol) ou la protéine privée de -SH (même poids que la précédente) sont ajoutées à du catéchol en solution à pH 6,8 ; puis on introduit la ppo. Pendant plus d'une heure le premier essai reste légèrement jaune, comme avant l'addition de l'enzyme ; le second au contraire devient rose en quelques secondes. Ceci prouve que la protéine privée de -SH ne s'oppose plus à la formation des pigments aminoquinones rouges.

2° Oxydation de dopa ou de 5,6-dihydroxyindole en présence de sérumalbumine ou d'ovalbumine.

Au cours de l'oxydation de la dopa en présence de ces protéines à -SH, le milieu devient rouge presque instantanément, puis lie-de-vin, et enfin noir. Lorsque l'oxydation porte sur le dihydroxyindole, la coloration est violet-gris (comme en l'absence de protéines) ou violet-bleu. Les pigments obtenus se comportant de façon tout à fait semblable, nous les étudierons en même temps. Même avec de fortes proportions de -SH (14 -SH par molécule de diphénol) on ne rencontre jamais de stade incolore. On obtient des pigments identiques (colorations et chromatographie) lorsque la dopa est oxydée en présence soit de sérumalbumine purifiée, soit de la sérumalbumine purifiée privée de -SH.

Dans la chromatographie en eau sur papier, les pigments noirs ou violets migrent avec la protéine, tout à fait en front, alors que le dopachrome présent au début de l'oxydation de la dopa garde son Rf habituel (environ 0,9). Ils ne se comportent pas comme les pigments mélaniques ordinaires qui, lorsque le dépôt n'est pas séché, migrent un peu moins que le dopachrome (lorsque le dépôt est séché, surtout à chaud, les pigments mélaniques s'insolubilisent. On peut aussi les relarguer de leurs pseudosolutions par une concentration suffisante de sels). Protéine et pigment semblent donc liés. Cependant, la consommation d'oxygène au cours de l'oxydation de la dopa n'est pas diminuée en présence de protéines. Au contraire, le troisième atome d'oxygène semble consommé plus vite comme si la protéine favorisait le réarrangement du dopachrome en DHI. Dans le cas du DHI, les courbes sont très voisines, qu'il soit oxydé seul ou en présence soit de GSSG, soit d'ovalbumine (1,4 ou 14 -SH par molécule de diphénol).

Deux types d'expériences ont montré la fragilité de la liaison mise en évidence par la chromatographie, prouvant ainsi qu'il ne s'agissait pas de liaisons covalentes : l'électrophorèse sur papier et le passage des milieux d'oxydation sur une colonne de gel de dextrane (« Sephadex » G 75) ; cette dernière technique nous a donné des résultats non reproductibles mais son mérite est de nous avoir fourni à partir de dopa oxydée en présence d'ovalbumine des fractions pigmentées (maximum peu marqué vers 280 mμ ; épaulements vers 330 et 550 mμ) dépourvues de protéines, grâce à un léger retard du pigment dans le coton placé au bas de la colonne. Ces fractions se comportent comme les pigments mélaniques ordinaires (migration nulle en électrophorèse ; Rf = 0,8 environ dans la chromatographie en eau). Ajoutées à de la sérumalbumine, elles reconstituent un pigment lié analogue au pigment formé dans l'oxydation de dopa en présence de cette protéine (même comportement chromatographique et électrophorétique).

L'électrophorèse sur papier à pH 8,6 (tampon véronal) ou à pH 6 (tampon phosphate) ne dissocie pas la sérumalbumine du pigment qui lui est lié. Par contre, celui qui est lié à de l'ovalbumine est abandonné par cette protéine et forme une plage grise nette au point de dépôt, s'estompant vers l'anode.

Si l'on ajoute du sérum humain aux fractions pigmentées privées de protéines après passage sur colonne de Séphadex, ou à des milieux d'oxydation de dopa (même anciens, conservés à 4°C) ou de DHI,

le pigment se lie aux globulines. Selon les conditions de l'électrophorèse le pigment est visible sur telle ou telle globuline (α_2 - β - γ). Il forme des plages grises nettes. Lorsque la quantité de sérum déposée est importante, certaines plages protéiques peuvent paraître grises elles aussi ; mais elles ne sont pas opaques aux ultraviolets, contrairement au pigment que l'on repère ainsi facilement. En fait, il semble que le pigment s'adsorbe sur toutes les protéines du sérum, mais n'est visible que sur celles qui, dans les conditions d'électrophorèse choisies, se trouvent ramassées en une bande étroite. Le pigment mieux concentré sur le papier devient alors visible.

Ces observations permettent de conclure que la dopaquinone et l'indole-5,6-quinone, contrairement à l'*ortho*-benzoquinone, ne peuvent se combiner ni aux -NH_2, ni aux -SH de l'ovalbumine ou de la sérum-albumine de bœuf ; par contre, les pigments mélaniques peuvent s'adsorber sur ces protéines et sur les globulines du sérum humain. On ne peut néanmoins préjuger de ce qui se passe au niveau de la peau, en présence des protéines cellulaires.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Les résultats que nous avons obtenus dans les différentes parties de notre travail appellent quelques remarques par comparaison avec les travaux antérieurs ou les résultats publiés depuis par d'autres chercheurs. Certains permettent d'avancer des hypothèses nouvelles, à propos de la composition des pigments naturels.

PEROXYDASES

a) L'oxydation par les peroxydases des phénols que nous avons étudiés présente un double intérêt : d'abord comme voie de dégradation possible de ces phénols au niveau des tissus ; ensuite, dans le cas particulier des hormones thyroïdiennes, comme processus susceptible de conduire à des produits actifs sur le plan physiologique. Nous avons pensé soumettre le produit X issu de la 3,5,3'-T_3 à des essais en ce sens ; nous avons été arrêtée par les difficultés que présente sa préparation en quantité suffisante.

b) Dans le domaine de la synthèse des hormones thyroïdiennes rien ne ressort de nos expériences pour attribuer aux peroxydases un rôle dans la condensation des iodotyrosines. Par contre, nous avons incidemment confirmé l'action des peroxydases sur l'iodation de la tyrosine et de la MIT.

Nos expériences sur la MIT et la DIT s'effectuaient toujours à un pH inférieur au pH 7,8 reconnu nécessaire à la condensation non enzymatique de deux molécules de DIT dans les travaux antérieurs [72].

Cependant, la formation d'un pont phényléther lorsque le *p*-crésol est soumis à l'action de l'eau oxygénée et de la peroxydase de raifort à pH 6,5 [172] incitait à penser que ce type d'enzyme induirait, par une réaction semblable, la formation des thyronines iodées à partir des tyrosines iodées.

Actuellement les recherches s'orientent vers l'étude d'une autre hypothèse : les hormones thyroïdiennes se formeraient par action des tyrosines iodées sur les acides 4-hydroxy-3-iodophénylpyruvique et 4-hydroxy-3,5-diiodophénylpyruvique, qui en dérivent par désamination oxydative [cf. 71 *bis*].

c) D'autre part, le fait que la myéloperoxydase agisse sur les mêmes phénols que la peroxydase de raifort, et de manière analogue, mérite d'être souligné. En effet, une peroxydase donnée ne peut pas utiliser n'importe quel composé comme « cosubstrat ». Un exemple typique est la peroxydase thyroïdienne utilisant les iodures, mais non les bromures contrairement à l'enzyme des glandes salivaires [2].

Il n'était donc pas inutile de vérifier la spécificité de la peroxydase de leucocytes vis-à-vis des phénols qui nous intéressent pour élargir la portée des résultats obtenus avec l'enzyme végétal.

TYROSINASES

a) A propos des expériences mettant en œuvre le mélanome de souris de HARDING-PASSEY, nous avons déjà noté qu'il agit sur la thyronine comme la ppoKZ ; il catalyse l'hydroxylation en *ortho* de la fonction phénol, et présente ainsi une activité de type tyrosinase. Sur les thyronines iodées, la similitude d'action paraît établie uniquement dans le cas de la 3-T_1 ; des phénomènes secondaires empêchent de conclure dans les autres cas.

Si l'on considère ces résultats du point de vue de la spécificité de l'enzyme, ils sont assez surprenants, car la tyrosinase de mammifères n'agit que faiblement, ou pas du tout, sur les phénols autres que la tyrosine et la dopa : dix fois moins sur la tyramine que sur la tyrosine, dix fois moins aussi sur l'adrénaline, la noradrénaline, le catéchol que sur la dopa ; la *para*-benzylhydroquinone — qui présente une certaine analogie de structure avec la thyronine — n'est que légèrement oxydée [110]. Il serait intéressant de comparer avec un enzyme purifié les activités sur la thyronine et sur la tyrosine.

b) Dans l'étude des étapes de la mélanogénèse, nous avons pu démontrer la présence des *ortho*-quinones monocycliques dérivées des *ortho*-diphénols apparentés à la dopa lors de l'oxydation de ces derniers par la tyrosinase. Il est certain aussi — ce que YASUNOBU et coll. ont supposé depuis à propos de peptides de tyrosine [178] sans apporter d'argument spécial — que le maximum d'absorption à 390 mμ doit leur être attribué. Mais alors, que penser de l'hypothèse de POLONOVSKI — passage direct de l'adrénaline ou de la dopa au leucodérivé de l'aminochrome — s'appuyant sur le comportement de la 3-hydroxyhordénine ? Il notait que l'oxydation par la tyrosinase de ce diphénol ne conduisait pas à des dérivés colorés. En réalité on n'obtient pas de coloration rouge comme avec les diphénols dont l'azote porte au moins un hydrogène, mais une faible coloration jaune. Or nous avons vu que les *ortho*-quinones monocycliques sont justement jaunes (*). Cette observation devenait donc compatible avec l'existence de la quinone qui ne se transformait pas en aminochrome rouge, parce que son azote était disubstitué. Or, lorsque nous avons cherché à mettre en évidence cette quinone monocyclique dans le milieu d'oxydation de l'hordénine par la ppoKZ, nous avons échoué : pas de maximum vers 390 mμ ; pas même de coloration rouge avec la DNPH ; par contre bonne disparition de l'hordénine, remplacée par l'hydroxyhordénine [cf. Chapitre II]. Tout se passait comme si la ppo refusait d'oxyder l'*ortho*-diphénol, résultat paradoxal (l'enzyme n'est pas inactivé, car si l'on ajoute à l'essai quelques cristaux de dopa, on observe la coloration rouge du dopachrome). Ce problème nous a paru intéressant du point de vue théorique. Nous avons cherché à mettre en évidence la formation de l'*o*-quinone

(*) Nous remarquerons que la 6-méthyldopa donne en présence de ppo une coloration jaune, alors que la dopa méthylée en 2 ou 5 donne une coloration rouge [34].

dérivée de la 3-hydroxyhordénine en faisant agir sur l'hordénine la ppo en présence de glutathion, et nous y sommes parvenue. Le glutathion se combine à la quinone — favorisant ainsi la réaction qui lui donne naissance, d'après la loi d'action de masse — et il apparaît le thioéther diphénolique en quantité suffisante pour être caractérisé par spectrophotométrie et par chromatographie. La quantité de thioéther est plus faible que dans le cas de la dopa, et le milieu contient encore de l'hydroxyhordénine si bien que le spectre n'est pas pur (maximums observés : 255 et 287 mμ). Mais les résultats expérimentaux sont suffisamment nets, pour nous permettre d'affirmer que la ppo est capable d'induire l'oxydation de l'hydroxyhordénine. Pourquoi la réaction est-elle donc si limitée en l'absence de glutathion ? A première vue, on pouvait raisonner comme pour la décoloration de la forme oxydée du 2,6-dichlorophénolindophénol par l'adrénaline [7]. L'adrénaline décolore cet indicateur d'oxydoréduction à cause de l'instabilité de l'adrénalinequinone formée dans la réaction : la disparition de celle-ci, transformée rapidement en adrénochrome, permet à la réaction d'être totale au lieu de rester très limitée. Un raisonnement analogue aurait permis d'expliquer par la stabilité relative de la quinone de la 3-hydroxyhordénine le maintien d'un équilibre où sa concentration aurait été très faible. En fait, ce raisonnement n'est pas légitime : si l'on considère d'une part les potentiels normaux d'oxydoréduction du catéchol et des diphénols apparentés (dopa, adrénaline et probablement 3-hydroxyhordénine) — de l'ordre de 0,8 [7] — d'autre part celui de l'oxygène moléculaire — 1,23 — ils sont tels que la réaction *o*-diphénol ⇄ *o*-quinone devrait être pratiquement totale de gauche à droite. Il nous est impossible de donner une explication satisfaisante des faits expérimentaux que nous avons recueillis.

c) Nous avons vu que l'étude des aminochromes en solution pure nous a permis de confirmer les résultats acquis par la spectrophotométrie directe des milieux d'oxydation, et de souligner la parenté des aminochromes entre eux. Leur structure doit donc être celle de l'adrénochrome [60, 73], dérivé du noyau 2,3-dihydroindole. D'autre part, la présence de substances indoliques fluorescentes (5,6-dihydroxyindole et son dérivé 2-carboxylique) dans les milieux d'oxydation de la dopa par un tissu formateur de mélanine — mélanome de souris — est en faveur de l'hypothèse que les mélanines naturelles dérivent de ces substances indoliques. Ce résultat s'inscrit dans la discussion que nous avons évoquée au cours de l'exposé bibliographique.

d) Après nos expériences d'oxydation des phénols en présence de glutathion, il est permis de se demander si la vieille affirmation [107, 109] que les groupements -SH inhibent la tyrosinase est réellement fondée. Dans nos conditions expérimentales, il est clair que l'enzyme fonctionne très bien. Pour savoir si une légère inhibition existe tout de même, il faudrait suivre la cinétique de la disparition de l'*ortho*-diphénol ou de l'apparition de la quinone : en effet la consommation d'oxygène dépend des réactions secondaires, différentes selon la présence ou l'absence de thiol, et sa mesure ne peut pas permettre de conclure sur la vitesse de la première réaction, proprement enzymatique. Dans le cas de la thiourée, et plus encore de la phénylthiourée, il existe une inhibition réelle, pendant un temps

plus ou moins long selon la quantité d'inhibiteur utilisée, à côté de la formation de thioéthers analogues à ceux qui sont formés avec le glutathion ou la cystéine [14].

La combinaison des thiols avec les quinones a pour effet, lorsqu'ils sont en quantité suffisante, d'empêcher la coloration du milieu et de diminuer la consommation d'oxygène ; on comprend donc que ces thiols aient pu passer pour inhibiteurs de l'enzyme quand la spectrophotométrie ou la chromatographie sur papier n'étaient pas employées. Fryor [142] a mis en doute l'existence d'une inhibition par les thiols de la tyrosinase des insectes. Il a étudié par manométrie l'oxydation en présence de glutathion de catéchol par une tyrosinase de champignon, et de tyramine par un extrait de larves de *Calliphora*. Mason [124] travaillant sur le catéchol a dégagé les deux étapes de la réaction : addition du thiol et de la quinone, puis éventuellement oxydation du thioéther diphénolique ainsi formé en thioéther quinonique coloré. Par contre, les expériences antérieures à notre travail portant sur l'oxydation en présence de thiols des *o*-diphénols à chaîne latérale aminée avaient conduit à des résultats confus, faute sans doute d'un excès de thiol. Kohn [102] avait étudié l'oxydation de tyrosine ou de dopa en présence de glutathion dans ces conditions défavorables. Mason et Peterson [130] avaient conclu (expériences non décrites) que la dopaquinone ne réagissait pas avec les thiols, contrairement à l'indole-5,6-quinone. Au moment même où nos expériences sur la dopa nous amenaient à admettre l'existence des thioéthers, Roston [153] publiait des résultats sur l'adrénaline et la noradrénaline qui nous parurent proches des nôtres : en présence de glutathion ou de cystéine, l'adrénochrome et le noradrénochrome — dosés par la fluorescence développée après alcalinisation des aminochromes en présence d'acide ascorbique — sont formés en moins grande quantité que dans les témoins où l'oxydation par la tyrosinase est conduite en l'absence de thiols, et après un temps de latence. L'intensité de la fluorescence obtenue, et le temps nécessaire à son apparition dépendent du rapport thiol/diphénol. Les groupements -SH disparaissent pendant la réaction, leur concentration étant négligeable au moment où l'aminochrome devient perceptible. Nos expériences sur ces substrats ont vérifié la formation de thioéthers diphénoliques dans ce cas. L'existence *in vivo* de tels composés n'est pas exclue, non plus que leur intervention au cours du métabolisme ou de l'action physiologique de l'adrénaline et de la noradrénaline. Le travail suivant de Roston [154] sur la dopa a recoupé nos propres résultats.

Puisque le thioéther diphénolique dérivé de l'indole-5,6-quinone est autoxydable, et capable de se condenser ensuite avec le thioéther diphénolique dérivé de la dopa en conduisant à des pigments noirâtres solubles, on peut envisager la formation *in vivo* de pigments de ce type, dans le règne animal ou végétal. Chez les animaux supérieurs, il suffirait que le mélanocyte contienne des composés sulfhydrylés, et l'on sait [51] que l'épiderme dans son ensemble en est riche. La copolymérisation de ce type de composés est un fait général. (cf. par exemple fig. 1, et [26, 28, 29]). Elle pourrait affecter à la fois le 5,6-dihydroxyindole et son dérivé 2-carboxylique, et les thioéthers diphénoliques de ces deux substances et de la dopa, pourvu que certains de ces composés soient sous la forme quinonique. La solubi-

lité du produit final dépendrait de sa composition. On obtiendrait ainsi des mélanines contenant du soufre. L'existence de soufre dans certaines mélanines naturelles [62] a été jusqu'à présent interprétée comme résultant de la présence de protéines sulfhydrylées liées à la mélanine par des covalences portant sur les groupements -SH.

e) Au sujet de l'association des mélanines naturelles aux protéines, l'hypothèse couramment adoptée [127] faisait intervenir des liaisons covalentes créées par combinaison de l'indole-5,6-quinone avec les groupements -SH des protéines. Or, si de telles combinaisons paraissent possibles dans le cas de l'*ortho*-benzoquinone issue du catéchol [124], il semble d'après nos expériences que les quinones rencontrées au cours de l'oxydation de la dopa ne réagissent pas avec les -SH protéiques ; c'est peut-être que les cyclisations et polymérisations interviennent avant qu'elles n'aient rencontré un tel groupement. Il s'agit peut-être aussi d'un facteur stérique, bien que les molécules de *p*-chloromercuribenzoate parviennent très rapidement à se combiner à une partie au moins des -SH, aussi bien dans la sérumalbumine de bœuf que dans l'ovalbumine. Il semble que la combinaison des quinones avec les protéines soit possible ou non selon la quinone envisagée. A côté des cas que nous avons déjà cités, indiquons que l'œstrone oxydée par une ppo se combine aux protéines, mais sans intervention des groupements -SH [87] ; la ménadione réagit avec les protéines, sauf si un agent bloquant les -SH est présent [32] ; les quinoneimides dérivées des 1,2-naphtoquinone et 1,2-fluorénoquinone [82], la 1,2-fluoréno-quinone-2-imine et l'indophénol qui en dérive [134] réagissent avec les groupements amines de la sérumalbumine de bœuf [82] ; la 1,2-naphtoquinone-1-benzimide oxyde la cystéine sans former avec elle de combinaison [82].

Toute expérience *in vitro* prête le flanc à la critique puisqu'il est impossible de recréer les conditions physiologiques exactes. Il se peut que la mélanine soit élaborée dans le mélanocyte au contact même des groupements protéiques auxquels les quinones pourront se combiner aussitôt formées. Il est plus simple d'imaginer que les liaisons entrant en jeu ne sont pas des covalences, mais des électrovalences, des liaisons hydrogène ou des forces de Van der Waals. Dans cette hypothèse, il serait facile d'expliquer l'expérience de Hackman et Todd [70] indiquée dans l'exposé bibliographique : l'adsorption des mélanines de dopa insolubles sur les protéines cuticulaires solubles conduisait dans leur cas à un produit insoluble parce que la quantité de protéines était faible par rapport à la quantité de dopa (50 mg pour 100 mg) ; l'inverse s'observe dans nos expériences où le produit est soluble parce que la protéine est en excès (250 à 500 mg pour 0,5 mg).

Il nous a été possible de séparer assez facilement la mélanine des protéines utilisées dans nos expériences. Mais ces protéines étaient en solution, alors que dans le mélanocyte la trame protéique du granule a une forme spiralée [12]. Une fois imprégnée de mélanine fortement polymérisée, elle doit ne plus pouvoir se séparer de cette couche de pigment, même si aucune covalence n'est en jeu.

TABLEAU VII

Observations chromatographiques

	Rf			Fluorescence en lumière de Wood	Réactions colorées			
	BA	MECA	H_2O		(1)	(2)	(3)	(4)
GSH	0,05	0,57	0,96		+	—		
GSSG	0,00	0,27	0,96		+	—		
CSH	0,18	0,70	0,96		+	—		
CSSC	0,00	0,27	0,96		+	—		
Tyr	0,17	0,68	0,85		+	—	—	
dopa	0,09	0,61	0,70		+	+	jaune	+
A ou dopa-SG	0,01	0,28	0,91		+	+	—	+
B	0,01	0,08			+	+	—	+
dopa-SC	0,01	0,29			+	+	—	+
dopachrome			0,91	opaque	—	+	+	
DHI	0,70	0,90	0,40	bleu-mauve	—	+	+	+
2-carboxy-DHI	0,40	0,80	de 0,20 à 0,70	bleu	—	+	+	+
α ou DHI-SG	0,04	0,57	0,89	bleu	+	+	+	+
β	0,00	0,23		bleu	?	+	+	+
α' ou 2-carboxy-DHI-SG	0,02	0,52	0,89	bleu	+	+	+	+
β'	0,00	0,22		bleu	?	+	+	+
dopachrome bisulfite	0,00	0,45	0,97	jaune	—	lent	+	
phosphates	0,03	0,50	0,96					
noradrénaline	0,20	0,75	0,16		—	+		
noradrénochrome	0,20		0,75	opaque	—	+	+	
noradrénaline-SG	0,01	0,28			+	+		
catéchol	0,85	0,98	0,70		—	+		
I ou catéchol-SG	0,07	0,62			+	+		
II	0,03	0,31			?	+		
dopamine	0,29		0,20		+	+		
dopaminochrome			0,70	opaque	—	+	+	
Thy	0,41	0,86			+	lent		jaune

(1) Avec la ninhydrine.
(2) Avec NO_3Ag am.
(3) Avec le réactif d'EHRLICH.
(4) Avec le réactif d'ARNOW.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Nous avons étudié l'oxydation par deux types d'enzymes de phénols apparentés à la tyrosine (tyrosines iodées, adrénaline, noradrénaline, dopa, dopamine, hordénine) et à la thyronine (thyronines iodées). Ces enzymes étaient des peroxydases d'origine végétale (de raifort) ou animale (de leucocytes) et des polyphénoloxydases ou tyrosinases d'origine végétale (de champignon ; hautement purifiée) ou animale (mélanome de souris). Des oxydations chimiques — par l'oxyde d'argent aux pH proches de la neutralité et par l'oxyde de plomb en milieu sulfurique — nous ont servi de termes de comparaison.

Les techniques les plus employées furent la chromatographie et l'électrophorèse sur papier, la manométrie avec un appareil de WARBURG, la spectrophotométrie avec un appareil enregistreur.

Nous avons vu ainsi que les peroxydases en présence d'eau oxygénée provoquent la polymérisation des monophénols étudiés. Les tyrosines et thyronines iodées sont en partie désiodées ; la rupture du pont phényléther des thyronines iodées a été observée dans quelques cas particuliers, mais pourrait se produire de manière plus générale ; cependant le pont phényléther de la thyronine n'est pas touché. Les *o*-diphénols sont transformés par les peroxydases et l'eau oxygénée en *o*-quinones qui suivent ensuite la même voie que lors des oxydations par les polyphénoloxydases.

Le mélanome de souris étudié a la même action sur la thyronine que la polyphénoloxydase de champignon : hydroxylation en *ortho* de la fonction phénol libre et rupture du pont phényléther qui conduit à la tyrosine. La grande activité du mélanome sur la thyronine est à souligner, car l'enzyme animal s'était montré peu actif vis-à-vis de tous les substrats étudiés jusqu'alors autres que la tyrosine et la dopa. L'action sur la 3-iodothyronine semble aussi identique à celle de l'enzyme végétal. Pour les autres iodothyronines, des phénomènes complexes empêchent de conclure.

Grâce en particulier à la spectrophotométrie rapide des milieux d'oxydation et à la formation de dérivés de la 2,4-dinitrophénylhydrazine, nous avons pu prouver l'existence des *o*-quinones monocycliques comme premiers produits de l'action de la polyphénoloxydase de champignon sur les *o*-diphénols à chaîne latérale aminée ; cette étape n'avait été mise en évidence que dans le cas du catéchol (1,2-dihydroxybenzène).

La présence de dérivés 2,3-dihydroindoliques et indoliques au cours de la mélanogénèse à partir de dopa a été confirmée dans le cas de l'enzyme végétal, et prouvée pour la première fois dans le cas du mélanome de souris.

Des expériences d'oxydation des phénols en présence de glutathion par la polyphénoloxydase de champignon conduisent à des thioéthers diphénoliques stables, par addition des *o*-quinones monocycliques au glutathion. Les indole-5,6-quinones peuvent s'additionner au glutathion de la même façon, mais les thioéthers obtenus s'oxydent spontanément à l'air et se polymérisent, éventuellement avec les thioéthers dérivés des quinones monocycliques. Ces polymères pourraient être inclus dans les mélanines et d'autres pigments naturels.

L'oxydation de dopa par la polyphénoloxydase végétale en présence de sérumalbumine de bœuf ou d'ovalbumine ne conduit pas à une mélanine liée à la protéine par des liaisons covalentes (qui résulteraient de la combinaison des quinones formées pendant la mélanogénèse aux fonctions thiols ou amines libres de la protéine). Cependant le polymère mélanique et la protéine sont liés par des forces d'adsorption. En effet, selon les conditions mises en œuvre pour analyser leur mélange, ils restent associés (chromatographie dans l'eau sur papier) ou se séparent (chromatographie sur gel de dextrane ou électrophorèse). De simples forces d'adsorption, électrovalences ou forces de Van der Waals pourraient parfaitement expliquer l'association étroite de la mélanine et de la trame protéique spiralée du granule sur laquelle elle se dépose dans les mélanocytes.

ABREVIATIONS

Tyr : tyrosine ; Thy : thyronine ; dopa : 3,4-dihydroxyphénylalanine ; MIT et DIT : 3-mono- et 3,5-diiodotyrosine ; T_1, T_2, T_3 : mono-, di- et tri-iodothyronine ; T_4 : thyroxine ; DHI : 5,6-dihydroxyindole ; 2-carboxy-DHI : 2-carboxy-5,6-dihydroxyindole ou acide 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylique ; DNPH : 2,4-dinitrophénylhydrazine ; ppo : polyphénoloxydase (ou tyrosinase) ; ppoKZ : ppo de KERTESZ et ZITO [97].

R : radical organique ; Ar : radical aromatique.

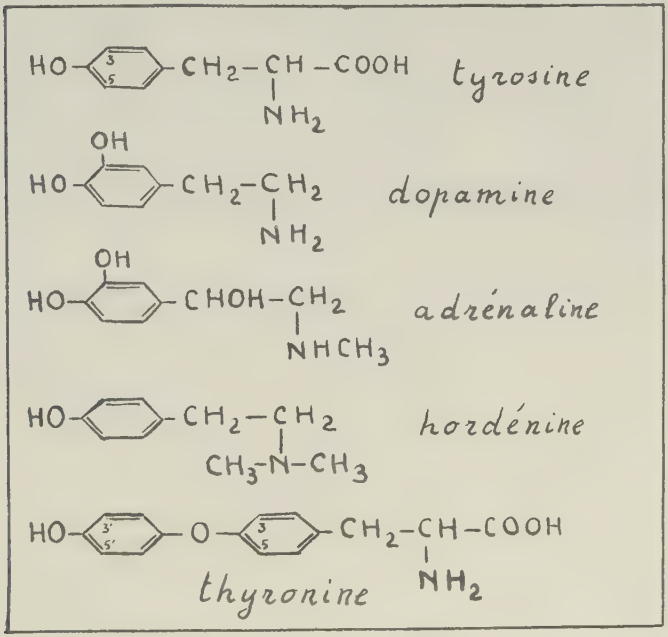
U.V. : rayons ultraviolets et zone des longueurs d'onde correspondantes ; λ : longueur d'onde ; D.O. : densité optique ; *o : ortho ; p : para.*

Solvants et réactifs décrits dans le chapitre II : BA : butanol acétique ; AA : amylol ammoniacal ; MECA : méthyléthylcétone acétique ; NO_3Ag am. : nitrate d'argent ammoniacal ; W_1 : papier Whatman 1 ; W_1 1 : papier Whatman 1 lavé ; 3 mm : papier Whatman 3 mm.

Unités : h., min., sec. : heure, minute, seconde ; l, ml, µl : litre, millilitre, microlitre ; g, mg, µg : gramme, milligramme, microgramme ; mµ : millimicron ; N, mN : normal, millinormal ; M, mM : molaire, millimolaire.

Un astérisque indique les composés radioactifs.

FORMULES (*)



(*) Voir aussi fig. 1.

BIBLIOGRAPHIE

1 — ALEXANDER, N.M., J. Biol. Chem. *234,* 1959, 1530.
2 — ALEXANDER, N.M., Endocrinol. *68,* 1961, 671.
3 — BACQ, Z.M., Pharmacol. Rev. *1,* 1949, 1.
4 — BACQ, Z.M., et FISCHER, P., Arch. Intern. Physiol. *57,* 1950, 271.
5 — BAKER, D. et NELSON, J.M., J. Gen. Physiol. *26,* 1943, 269.
6 — BAKER, R.V., BIRBECK, M.S.C., BLASCHKO, H., FITZPATRICK, T.B. et SEIJI, M., Nature *187,* 1960, 392.
7 — BALL, E.G. et CHEN, T.T., J. Biol. Chem. *102,* 1933, 691.
8 — BEER, R.J.S., CLARK, K. et ROBERTSON, A., J. Chem. Soc. 1948, 2223.
9 — BERTLER, A. et ROSENGREN, E., Experientia *15,* 1959, 10.
10 — BERTRAND, D., Bull. Soc. Chim. Biol. *31,* 1949, 1474.
11 — BINNS, F. et SWAN, G.A., Chem. and Ind. 1957, 396.
12 — BIRBECK, M.S.C. et BARNICOT, N.A., dans « Pigment Cell Biology » 1959, Gordon Ed., Academic Press (N.Y.), p. 549.
13 — BOUCHILLOUX, S., C.R. Soc. Biol. *153,* 1959, 642.
14 — BOUCHILLOUX, S., Bull. Soc. Chim. Biol. *155,* 1961, 1325.
15 — BOUCHILLOUX, S., KERTESZ, D. et LISSITZKY, S., C.R. Soc. Biol. *50,* 1956, 399.
16 — BOUCHILLOUX, S., et KODJA, A., Bull. Soc. Chim. Biol. *42,* 1960, 65.
17 — BOUCHILLOUX, S. et KODJA, A., Bull. Soc. Chim. Biol. *42,* 1960, 1045.
17 *bis* — BOUCHILLOUX, S. et LISSITZKY, S., Bull. Soc. Chim. Biol. *40,* 1958, 833.
18 — BOWNESS, J.M. et MORTON, R.A., Biochem. J. *51,* 1952, 530.
19 — BOWNESS, J.M. et MORTON, R.A., Biochem. J. *53,* 1953, 620.
20 — BOWNESS, J.M., MORTON, R.A., SHAKIR, M.H. et STUBBS, A.L., Biochem. J. *51,* 1952, 521.
21 — BOYER, P.D., J. Am. Chem. Soc. *76,* 1954, 4331.
22 — BROWN, F.C. et WARD, D.N., J. Biol. Chem. *233,* 1958, 77.
23 — BROWN, F.C. et WARD, D.N., Proc. Soc. Expl. Biol. Med. *100,* 1959, 701.
24 — BROWN, F.C., WARD, D.N. et GRIFFIN, A.C., dans « Pigment Cell Biology », 1959 (ouvrage cité), p. 525.
25 — BROWN, F.C. et WHITE, J.B., J. Biol. Chem. *236,* 1961, 911.
26 — BRUCE, J.M., J. Appl. Chem. *4,* 1954, 469.
27 — BUHLER, D. et MASON, H.S., Arch. Biochem. Biophys. *92,* 1961, 424.
28 — BU'LOCK, J.D., J. Chem. Soc., 1961, 52.
29 — BU'LOCK, J.D. et HARLEY-MASON, J., J. Chem. Soc., 1951, 703.
30 — BU'LOCK, J.D. et HARLEY-MASON, J., J. Chem. Soc., 1951, 712.
31 — BURTON, H. et STOVES, J.L., Nature *165,* 1950, 569.
32 — CANADY, W.J., et ROE, J.H., J. Biol. Chem. *220,* 1956, 571.
33 — COHEN, G.N. et NISMAN, B., Bull. Soc. Chim. Biol. *29,* 1947, 265.
34 — CROMARTIE, R.I.T. et HARLEY-MASON, J., Biochem. J. *66,* 1957, 713.
35 — CURZON, G., Biochem. J. *79,* 1961, 656.
36 — DALGLIESH, C.E., Arch. Biochem. Biophys. *58,* 1955, 214.
37 — DAWSON, S.R. et TARPLEY, W.B. dans « The Enzymes » 1951, Summer et Myrbäck Ed., Academic Press (N.Y.), II, p. 454.
38 — DENNELL, R., Nature *180,* 1957, 1070.
39 — DENNELL, R., Proc. Roy. Soc. B *148,* 1958, 270.
40 — DENNELL, R., Biol. Rev. *33,* 1958, 178.
41 — DEROUAUX, G., Arch. Intern. Pharmacodyn. *69,* 1943, 205.

42 — DRESSLER, H. et DAWSON, C.R., Biochim. Biophys. Acta *45*, 1960, 508.
43 — DRESSLER, H. et DAWSON, C.R., Biochim. Biophys. Acta *45*, 1960, 515.
44 — DULIERE, W.L. et RAPER, H.S., Biochem. J. *24*, 1930, 239.
45 — ELLIOTT, K.A.C., Biochem. J. *26*, 1932, 10.
46 — ELLIOTT, K.A.C., Biochem. J. *26*, 1932, 1281.
47 — FELSENFELD, G., Arch. Biochem. Biophys. *87*, 1960, 247.
48 — FISCHER, P. et LECOMTE, J., Arch. Intern. Physiol. *58*, 1950, 236.
49 — FISCHER, P., LECOMTE, J. et de LANDTSHEER, L., Nature *166*, 1950, 1116.
50 — FITZPATRICK, T.B., BRUNET, P. et KUKITA, A., dans « The Biology of Hair Growth » 1958, Montagna et Ellis Ed., Academic Press (N.Y.).
51 — FLESCH, P. et ROTHMAN, S., Science *108*, 1948, 505.
52 — FORSYTH, W.G.C., QUESNEL, V.C. et ROBERTS, J.B., Biochim. Biophys. Acta *37*, 1950, 322.
53 — FOSTER, M. et BROWN, S.R., J. Biol. Chem. *225*, 1957, 247.
54 — FRIEDEN, E., BIGELOW, C. et OTTESEN, M., Feder. Proc. *18*, 1959, 230.
54 *bis* — FRIEDEN, E. et OTTESEN, M., Biochim. Biophys. Acta *34*, 1959, 248.
55 — FROMAGEOT, C., JUTISZ, M. et LEDERER, E., Biochim. Biophys. Acta *2*, 1948, 487.
56 — FUZEAU-BRAESCH, S., Thèse Doct. Sciences Nat. Paris 1960.
57 — GELLER, E., EIDURON, S. et YUWILER, A., J. of Neurochemistry *5*, 1959, 73.
58 — GLASSMAN, E., Arch. Biochem. Biophys. *67*, 1957, 74.
59 — GONNARD, P. et ALLUCHON, C., Bull. Soc. Chim. Biol. *36*, 1954, 1101.
60 — GREEN, D.E. et RICHTER, D., Biochem. J. *31*, 1937, 596.
61 — GREEN, S., MAZUR, A. et SHORRE, E., J. Biol. Chem. *220*, 1956, 237.
62 — GREENSTEIN, J.P., TURNER, F.C. et JENRETTE, W.V., J. Natl. Cancer Inst. *1*, 1940, 337.
63 — GRIEG, M.E. et GIBBONS, A.J., Arch. Biochem. Biophys. *72*, 1957, 340.
64 — GROSS, A.J. et SIZER, I.W., Feder. Proc. *14*, 1955, 64.
65 — GROSS, A.J. et SIZER, I.W., J. Biol. Chem. *234*, 1959, 1611.
66 — HACKMAN, R.H., Biochem. J. *54*, 1953, 362.
67 — HACKMAN, R.H., Biochem. J. *54*, 1953, 367.
68 — HACKMAN, R.H., Biochem. J. *54*, 1953, 371.
68 *bis* — HACKMAN, R.H., Proceed. IVth Intern. Congress of Biochemistry, Vienna 1958, Pergamon Press, Vol. XII.
69 — HACKMAN, R.H., PRYOR, M.G.M. et TODD, A.R., Biochem. J. *43*, 1948, 474.
70 — HACKMAN, R.H. et TODD, A.R., Biochem. J. *55*, 1953, 631.
71 — HAGEN, P., Pharmacol. Rev. *11*, 1959, 361.
71 *bis* — HANEY, J.F.B. et LISSITZKY, S., Biochim. Biophys. Acta *63*, 1962, 557.
72 — HARINGTON, C.R. et PITT-RIVERS, R.V., Biochem. J. *39*, 1945, 157.
73 — HARLEY-MASON, J., J. Chem. Soc., 1950, 1276.
74 — HEACOCK, R.A., NERENBERG, C. et PAYZA, A.N., Can. J. Chem. *36*, 1958, 853.
75 — HEACOCK, R.A. et SCOTT, B.D., Can. J. Biochem. Physiol. *37*, 1959, 1087.
76 — HELFERICH, B. et KLEIN, W., Ann. Chem. *450*, 1926, 225.
77 — HESS, E.H., Arch. Biochem. Biophys. *74*, 1958, 198.
78 — HOGEBOOM, G.H. et ADAMS, M.H., J. Biol. Chem. *145*, 1942, 273.
79 — HOLTZ, P., Pharmacol. Rev. *11*, 1959, 315.
80 — HUGHES, G.M.K. et SAUNDERS, B.C., J. Chem. Soc., 1954, 4630.
81 — HUMOLLER, F.L., MOCKLER, M.P., HOLTHAUS, J.M. et MAHLER, D.J., J. Lab. Clin. Med. *56*, 1960, 222.
82 — IRVING, C.C. et GUTMANN, H.R., J. Biol. Chem. *234*, 1959, 2878.
83 — JACKSON, H., Biochem. J. *33*, 1939, 1452.
84 — JACKSON, H. et KENDAL, L.P., Biochem. J. *44*, 1949, 477.
85 — JAMES, W.O. « Plant Respiration », 1953, Clarendon Press (Oxford).
86 — JAMES, W.O., ROBERTS, E.A.H., BEEVERS, H. et de KOCK, P.C., Biochem. J. *43*, 1948, 626.
87 — JELLINCK, P.H., Biochem. J. *73*, 1959, 30 P.

88 — JOHNSON, T.B. et TEWSKESBURY, L.B., Proc. Natl. Acad. Sci. *28,* 1942, 73.
89 — JONES, B.M. et SINCLAIR, W., Nature *181,* 1958, 926.
90 — KENDAL, L.P., Biochem. J. *44,* 1949, 442.
91 — KERTESZ, D., Nature *168,* 1951, 697.
92 — KERTESZ, D., Biochim. Biophys. Acta *9,* 1952, 170.
93 — KERTESZ, D., Bull. Soc. Chim. Biol. *35,* 1953, 1157.
94 — KERTESZ, D., J. Natl. Cancer Inst. *14,* 1954, 1081.
95 — KERTESZ, D., C.R. Soc. Biol. *151,* 1957, 1076.
96 — KERTESZ, D. et ALBANO, A., Cancer. Research *15,* 1955, 394.
97 — KERTESZ, D. et ZITO, R., Nature *179,* 1957, 1017.
97 *bis* — KERTESZ, D. et ZITO, R., dans HAYAISHI, « Oxygenases », Academic Press (N.Y.) à paraître.
98 — KIKKAWA, H., OGITA, Z. et FUGITO, S., Science *121,* 1955, 43.
99 — KIRSHNER, N., Pharmacol. Rev. *11,* 1959, 350.
100 — KLEBANOFF, S.J., J. Biol. Chem. *234,* 1959, 2437.
101 — KLEBANOFF, S.J., J. Biol. Chem. *235,* 1960, 52.
102 — KOHN, R.R., Enzymologia *17,* 1955, 193.
103 — KRUEGER, R.C., Feder. Proc. *18,* 1959, 267.
104 — KUKITA, A. et FITZPATRICK, T.B., Science *121,* 1955, 893.
105 — LAXER, G. et WHEWELL, C.S., Chem. and Ind. 1954, 127.
106 — LERNER, A.B., Adv. in Enzymol. *14,* 1953, 73.
107 — LERNER, A.B. et FITZPATRICK, T.B., Physiol. Rev. *30,* 1950, 91.
108 — LERNER, A.B., FITZPATRICK, T.B., CALKINS, E. et SUMMERSON, W.H., J. Biol. Chem. *178,* 1949, 185.
109 — LERNER, A.B., FITZPATRICK, T.B., CALKINS, E. et SUMMERSON V.H., J. Biol. Chem. *187,* 1950, 793.
110 — LERNER, A.B., FITZPATRICK, T.B., CALKINS, E. et SUMMERSON W.H., J. Biol. Chem. *191,* 1951, 799.
111 — LILLIE, R.D., Am. Med. Ass. Arch. Pathol. *64,* 1957, 100.
112 — LISSITZKY, S., BENEVENT, M.T. et ROQUES, M., C.R. Soc. Biol. *154,* 1960, 147.
113 — LISSITZKY, S. et BOUCHILLOUX, S., Ciba Foundation, Colloquia on Endocrinol. *10,* 1957, 135.
114 — LISSITZKY, S. et BOUCHILLOUX, S., Bull. Soc. Chim. Biol. *39,* 1957, 1215.
115 — LISSITZKY, S., BOUCHILLOUX, S. et MAYRARGUE-KODJA, A., C.R. Soc. Biol. *151,* 1957, 350.
115 *bis* — LISSITZKY, S. et ROLLAND, M., Biochim. Biophys. Acta *56,* 1962, 95.
116 — LISSITZKY, S. et ROQUES, M., C.R. Soc. Biol. *150,* 1956, 536.
117 — LISSITZKY, S. et ROQUES, M., Bull. Soc. Chim. Biol. *39,* 1957, 521.
118 — LISSITZKY, S., ROQUES, M. et BENEVENT, M.T., C.R. Soc. Biol. *154,* 1960, 396.
119 — LJUNGGREN, J.G., Acta. Chem. Scand. *11,* 1957, 1072.
120 — LJUNGGREN, J.G., Acta. Chem. Scand. *15,* 1961, 1772.
121 — Mac COSKER, P.J. Nature *190,* 1961, 887.
122 — MALEK, S.R.A., Nature *180,* 1957, 237.
123 — MASON, H.S., J. Biol. Chem. *172,* 1948, 83.
123 *bis* — MASON, H.S., J. Biol. Chem. *181,* 1949, 803.
124 — MASON, H.S., Nature *175,* 1955, 771.
125 — MASON, H.S., Adv. in Enzymol. *16,* 1955, 105.
126 — MASON, H.S., Nature *177,* 1956, 79.
127 — MASON, H.S., dans « Pigment Cell Biology » 1959 (ouvrage cité), p. 563.
128 — MASON, H.S., ONOPRIENKO, I. et BUHLER, D., Biochim. Biophys. Acta *24,* 1957, 225.
129 — MASON, H.S. et PETERSON, E.W., J. Biol. Chem. *212,* 1955, 485.
130 — MASON, H.S. et PETERSON, E.W., 1958, dans 127.
131 — MAYRARGUE-KODJA, A., BOUCHILLOUX, S. et LISSITZKY, S., Bull. Soc. Chim. Biol. *40,* 1958, 815.
132 — MIRANDA, F. et LISSITZKY, S., J. of Chromatog. *2,* 1959, 354.
133 — MIYAMOTO, M. et FITZPATRICK, T.B., Science *126,* 1957, 449.
134 — NAGASAWA, H.I. et GUTMANN, H.R., J. Biol. Chem. *234,* 1959, 1593.

135 — NAGASAWA, H.I., GUTMANN, H.R. et MORGAN, M.A., J. Biol. Chem. *234,* 1959, 1600.
136 — NEUFELD, H.A., LEVAY, A.N., LUCAS, F.V., MARTIN, A.P. et STOTZE, J. Biol. Chem. *233,* 1958, 209.
137 — NICOLAUS, R.A., PIATTELLI, M. et NARNI, G., Rend. Acc. Sc. fis. e mat. *27,* 1960, 1.
137 *bis* — OSMOND, H., New Scientist *267,* 1961, 777.
138 — PIATTELLI, M. et NICOLAUS, R.A., Rend. Acc. Sc. fis. e mat. *27,* 1960, 499.
139 — PITT-RIVERS, R.V., Biochem. J. *43,* 1948, 223.
140 — POLIS, B.D. et SHMUKLER, H.W., J. Biol. Chem. *201,* 1953, 475.
141 — POLONOVSKI, M., « Eléments de Biochimie Médicale » 1941, Masson Ed. (Paris), p. 413.
142 — PRYOR, M.G.M., J. Expl. Biol. *32,* 1955, 468.
143 — PUGH, C.E.M., Biochem. J. *24,* 1930, 1442.
144 — RANGIER, M., Compt. Rend. Acad. Sci. *220,* 1945, 246.
145 — RAPER, H.S., Biochem. J. *21,* 1927, 89.
146 — RAPER, H.S., Biochem. J. *21,* 1927, 1370.
147 — RAPER, H.S., Physiol. Rev. *8,* 1928, 245.
148 — RILEY, V., HOBBY, G. et BURK, D. dans « Pigment Cell Growth » 1953, Gordon Ed., Academic Press (N.Y.), p. 231.
149 — ROBERTS, E.A.H., Chem. and Ind., 1959, 995.
150 — ROCHE, J., MICHEL, R. et WOLF, W., Bull. Soc. Chim. France 1957, 462.
151 — ROCHE, J., MICHEL, R. et WOLF, W., Bull. Soc. Chim. France 1957, 464.
151 *bis* — ROLLAND, M. et LISSITZKY, S., Biochim. Biophys. Acta *56,* 1962, 83.
152 — ROSKAM, J., dans Exposés Annuels de Biochimie Médicale, 1946, 6e série, Masson Ed. (Paris).
153 — ROSTON, S., Arch. Biochem. Biophys. *85,* 1959, 74.
154 — ROSTON, S., J. Biol. Chem. *235,* 1960, 1002.
155 — RUIZ-GIJON, J., Nature *166,* 1950, 831.
156 — SANKAR, D.V., Feder. Proc. *18,* 1959, 441.
157 — SCHAYER, R.W. et SMILEY, R.L., J. Biol. Chem. *202,* 1953, 425.
158 — SIZER, I.W., Feder. Proc. *6,* 1947, 20.
159 — SERRA, J.A., Nature *157,* 1946, 771.
160 — SOLSONA, M., Revist. Espan. de Fisiol. *8,* 1952, 191.
161 — STEIN, W.D., Nature *175,* 1955, 256.
162 — STOVES, J.L., Research (London), *6,* 1953, 298.
163 — SEIJI, M. et FITZPATRICK, T.B., J. Biochem. (Japan) *49,* 1961, 700.
164 — SZABO, G., Am. Med. Ass. Arch. Dermatol. *76,* 1957, 324.
165 — TRAUTNER, E.M. et ROBERTS, E.A.H., Australian J. Sci. Research B 3, 1951, 356.
166 — UDENFRIEND, S., CLARK, C.T., AXELROD, J. et BRODIE, J., J. Biol. Chem. *208,* 1954, 731.
167 — UMBREIT, W.W., BURRIS, R.H. et STAUFFER, J.F., « Manometric techniques and tissue metabolism » 1949, Burgess Publishing Co (Minneapolis U.S.A.).
168 — Van DUIJN, P., Acta Physiol. Pharmacol. Neerl. *5,* 1957, 413.
169 — VERLY, W., Arch. Intern. Physiol. *56,* 1948, 1.
170 — VOHRA, P. et KRATZER, F.H., Proc. Soc. Expl. Biol. Med. *100,* 1959, 837.
171 — WAJZER, J., Bull. Soc. Chim. Biol. *28,* 1946, 345.
172 — WESTERFELD, W.W. et LOWE, C., J. Biol. Chem. *145,* 1942, 463.
173 — WOODFORD, V.R., Can. J. Biochem. Physiol. *37,* 1959, 873.
174 — WOSILAIT, W.D., NASON, A. et TERRELL, A.J., J. Biol. Chem. *206,* 1954, 271.
175 — YASUNOBU, K.T., Nature *180,* 1957, 441.
176 — YASUNOBU, K.T., dans « Pigment Cell Biology », 1959 (ouvrage cité), p. 583.
177 — YASUNOBU, K.T. et DANDLIKER, W.B., J. Biol. Chem. *224,* 1957, 1065.
178 — YASUNOBU, K.T., PETERSON, E.W. et MASON, H.S., J. Biol. Chem. *234,* 1959, 3291.
179 — YASUNOBU, K.T., THOMSON, J.C.G. et MASON, H.S., Feder. Proc. *16,* 1957, 1176.

DEUXIEME THESE

PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTÉ

THERMOGENESE CHEZ LES VEGETAUX

VU ET PERMIS D'IMPRIMER,
Le Recteur de l'Académie d'Aix-Marseille :
J. BLACHE.

Aix-en-Provence, le 5 octobre 1962.

Imprimerie DE MARCHI
22, Ch. St-Jean-du-Désert
M A R S E I L L E